

Code No. 6019

研究用

TaKaRa

Mighty TA-cloning Reagent
Set for PrimeSTAR[®]

说明书

目 录

内 容	页码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 试剂盒以外所需试剂	1
● 保 存	1
● pMD20-T vector	1
● 使用注意事项	2
● 实验操作	2
● Control 反应	3
● 相关产品	4

● 制品说明

使用 *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 反应，扩增获得的 PCR 产物 3' 端附有一个“A”碱基。利用 3' 端附有“A”碱基的 PCR 产物进行克隆时，与含有 3' -T 末端的载体通过 T-A 碱基互补配对原则进行克隆，此种方法被称为 T-A 克隆。Mighty TA-cloning Kit (Code No. 6028)是在短时间内快速地将 PCR 产物进行 T-A 克隆的试剂盒。连接反应使用 DNA Ligation Kit<Mighty Mix>，操作简便，可在短时间内高效地进行连接反应。但使用 PrimeSTAR 系列的 α 型 DNA 聚合酶进行 PCR 反应时，因酶本身具有极强的 3' \rightarrow 5' Exonuclease 活性，扩增产物几乎都为平滑末端，不能直接进行 TA 克隆。PrimeSTAR 系列 DNA 聚合酶的 PCR 产物进行 TA 克隆时，3' 端必须添加“A”碱基。

本试剂盒中含有 (A-overhang mixture)，可简单地对 PrimeSTAR 系列 DNA 聚合酶的 PCR 产物 3' 端添加“A”碱基。A-overhangmixture 与 MightyTA-cloning Kit 配套使用，是 PrimeSTAR 系列 DNA 聚合酶 PCR 扩增产物的 TA 克隆专用试剂。

● 制品内容 (20 次量)

Mighty TA-cloning Kit

pMD20-T vector (50 ng/ μ l)	20 μ l
Ligation Mighty Mix* ¹	50 μ l \times 2
Positive Control Insert* ²	10 μ l
<hr/>	
A-overhang mixture	
A-overhang enzyme	10 μ l
10 \times Buffer	20 μ l
dATP	10 μ l

*1: Ligation Mighty Mix 与 DNA Ligation Kit<Mighty Mix> (Code No. 6023)是同一种试剂。

*2: 3' 端带有 A 碱基约 200 bp DNA 片段。(以 *E.coli* 基因组 DNA 为模板，使用 *TaKaRa Ex Taq*[®] 进行 PCR 反应得到的扩增产物。)(10 ng/ μ l)

● 试剂盒以外所需试剂

- PCR 扩增产物回收、纯化用试剂 (参考实验操作)
- Competent cell 或 ElectroCell (*E. coli*)
- SOC 培养基
- 含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板

● 保 存: -20 $^{\circ}$ C

● pMD20-T vector

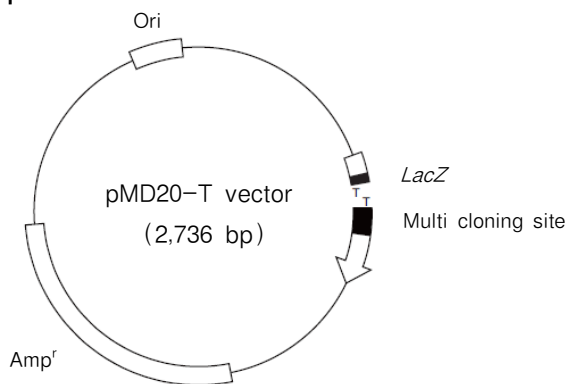


图 1. pMD20-T 载体图谱

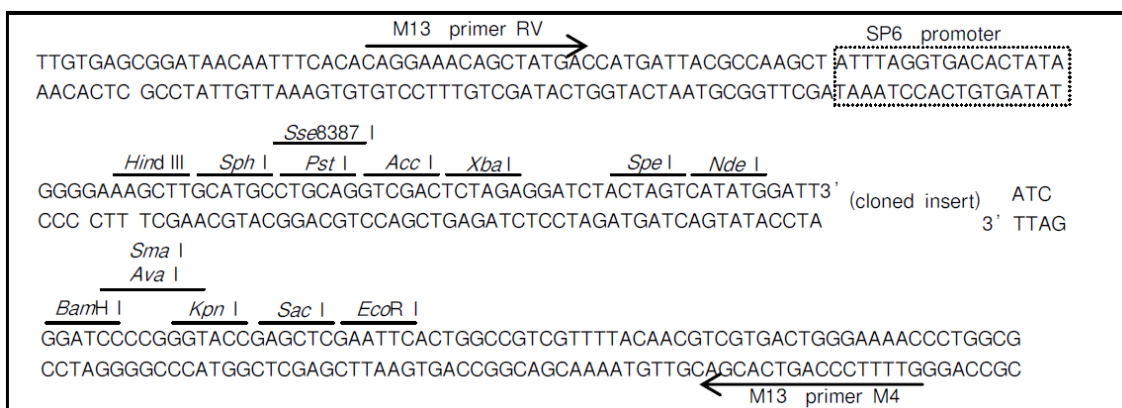


图 2. pMD20-T 的多克隆位点

● 使用注意事项

1. Ligation Mighty Mix 在冰上融解，轻轻混合后再使用。
2. 克隆时，根据插入片段的长度和方向，有时即使插入了 DNA 片段也会有不出现终止密码或读码框不改变的情况发生，在蓝白选择培养基上会形成淡蓝色菌落。出现这种现象时，建议进行菌落 PCR 确认插入片段。
3. 进行切胶回收纯化 DNA 片段时要避免 UV 照射时间过长。长时间照射，DNA 会受到损伤，影响克隆效率。
4. 当 PCR 扩增用质粒模板与克隆载体（pMD20-T vector；具有 Amp^r）有同样的选择标记基因时，为防止出现质粒模板自身的转化菌落，建议切胶回收扩增片段后再进行克隆。

● 实验操作

(1) 目的片段的扩增和精制

使用 PrimeSTAR HS DNA Polymerase、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase、PrimeSTAR Max DNA Polymerase 和 Tks Gflex™ DNA Polymerase 进行目的片段的 PCR 扩增，取少量扩增后反应液进行电泳确认。

- 扩增产物为单一条带时，可以通过苯酚/氯仿抽提、乙醇沉淀进行纯化。还可以使用 QuickClean™ Enzyme Removal Resin (Code No. 631770) * 纯化扩增产物。再进行步骤 (2) 的 3' 末端加“A”反应。

*：使用 QuickClean Enzyme Removal Resin 时，请按照下面的操作流程进行 DNA 纯化。

1. 充分悬浮 QuickClean Enzyme Removal Resin。
2. 将 PCR 反应液移至 1.5 ml 离心管中，加入 1/10 量的 QuickClean™ Enzyme Removal Resin，充分振荡混合 10~20 秒。
3. 10,000 rpm 离心 1 分钟，将上清液移至新的 1.5 ml 离心管中。（注意：吸取上清液时，不要混入 QuickClean Enzyme Removal Resin）。
4. 回收上清液后，重复操作步骤 1~3。上清液作为 DNA 回收液进行步骤 (2) 的 3' 末端加“A”反应。

- 当扩增产物中有引物二聚体或非特异性扩增产物时，要切胶回收目的片段。此时，可以使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250) 等试剂盒纯化目的片段。然后再进行步骤 (2) 的 3' 末端加“A”反应。

(2) 加“A”反应

1. 在微量离心管中按照下列组份配制反应液后充分混合

回收的 DNA 溶液	8 μ l
10 \times Buffer	1 μ l
dATP	0.5 μ l
<u>A-overhang enzyme</u>	<u>0.5 μl</u>
Total	10 μ l

2. 65 $^{\circ}$ C反应 10 分钟。

3. 反应液用于步骤 (3) 的连接反应。

[注意]: 加“A”反应后, 尽量立即进行连接反应。

(3) 连接反应

1. 取 1 μ l^{*1}加“A”后 PCR 产物到新的 microtube 中。

2. 加入 1 μ l pMD20-T vector 和 3 μ l^{*1} 灭菌水, 混匀。

* 1: 可适当调整添加量。只要 PCR 产物和灭菌水总体积是 4 μ l 即可。

3. 加入 5 μ l Ligation Mighty Mix, 轻轻混匀。

4. 16 $^{\circ}$ C保温 30 分钟。

5. 全量加入至 100 μ l Competent cells^{*2}中进行转化。

需要进行电转化时, 要进行酚氯仿抽提和乙醇沉淀纯化, 置换缓冲液后再进行转化。

* 2: 可以使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells、*E. coli* JM109 Competent Cells。

(使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells 时, 不需要添加 IPTG)。

6. 涂布于含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板^{*3}。

* 3: 可使用 SOC 培养基适当稀释后, 再涂布于数个 LB 平板上。

7. 37 $^{\circ}$ C过夜培养, 通过蓝/白菌落筛选挑选出白色菌落。

(4) 插入片段的确认

采用菌落 PCR 方法可简单、快速地检测大肠杆菌重组质粒中的插入片段。

使用 pMD20-T vector 的一对引物 M13 primer M4 和 M13 primer RV, M13 primer M4、M13 primer RV 与 EmeraldAmp PCR Master Mix 或 SapphireAmp Fast PCR Master Mix 配套使用, 可快速确认有无插入片段。

【实验例】

使用 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 扩增获得 2 kb 扩增产物 (单一条带), 按照本试剂盒的操作流程, 在 3' 末端加“A”与 pMD20-T vector 进行连接反应后, 使用 *E. coli* JM109 Competent Cells (Code No. 9052) 转化时, 形成约 1×10^3 阳性菌落。

● Control 反应

1. 取 1 μ l Positive Control Insert 加入到新的 microtube 中。

2. 加入 1 μ l pMD20-T vector 和 3 μ l 灭菌水后混匀。

3. 加入 5 μ l Ligation Mighty Mix, 轻轻混匀。

4. 16 $^{\circ}$ C反应 30 分钟。

5. 全量加入至 100 μ l Competent cells^{*1}中进行转化。

需要进行电转化时, 要进行酚氯仿抽提和乙醇沉淀纯化, 更换缓冲液后再进行转化。

* 1: 可以使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells、*E. coli* JM109 Competent Cells。

(使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells 时, 不需要添加 IPTG)。

6. 涂布于含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板。

7. 37°C过夜培养, 通过蓝/白菌落筛选挑选出白色菌落*2。

*2: 使用转化效率为 1×10^8 菌落/ μg pUC119 DNA 的 *E. coli* JM109 Competent Cells 时, 50 ng 载体可获得 $1 \sim 5 \times 10^4$ 个白色菌落。

● 相关产品

Mighty TA-cloning Kit (Code No. 6028)

Reagent Set for Mighty Cloning Kit (Blunt End) (Code No. 6027)

T-Vector pMD20 (Code No. 3270)

E. coli HST08 Premium Competent Cells (Code No. 9128)

E. coli HST08 Premium Electro-Cells (Code No. 9028)

E. coli JM109 Competent Cells (Code No. 9052)

E. coli JM109 Electro-Cells (Code No. 9022)

QuickClean™ Enzyme Removal Resin (Code No. 631770)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)

M13 Primer M4 (Code No. 3832A/B)

M13 Primer RV (Code No. 3830A/B)

<PCR 酶>

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Code No. R010A/B)

PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Code No. R050A/B)

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Code No. R045A)

Tks Gflex™ DNA Polymerase (Code No. R060A/B)

<检测插入 DNA 片段用>

EmeraldAmp® PCR Master Mix (Code No. RR300A/B)

EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (Code No. RR300A)

SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (Code No. RR350A/B)

PrimeSTAR, *TaKaRa Ex Taq*, EmeraldAmp, and SapphireAmp are registered trademarks of TAKARA BIO INC.

Tks Gflex is a trademark of TAKARA BIO INC.

注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品, 或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权, 请联络我们, 或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术(北京)有限公司翻译制作, 最新版本文件请参考 TAKARA BIO INC.网站。为正确使用 Takara 产品, 您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>