

Code No. 6025

研究用

Takara

DNA Blunting Kit

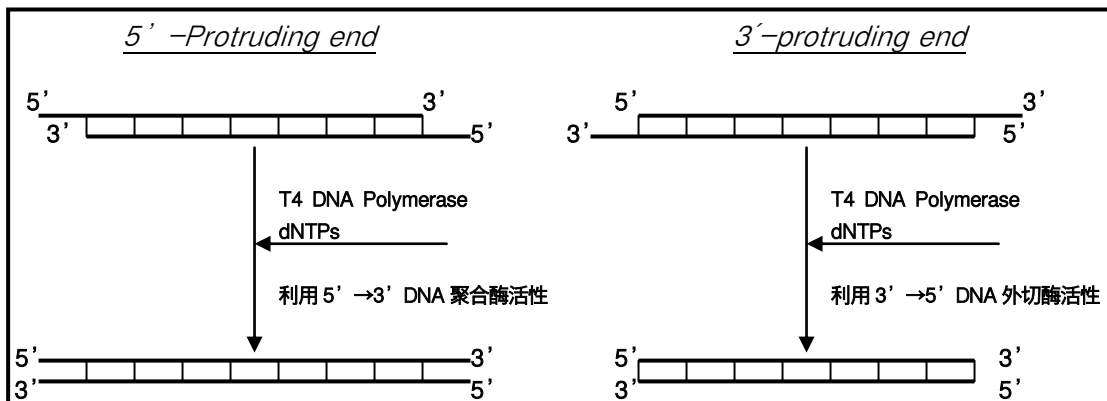
说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 操作方法	1
A. 载体 DNA 的去磷酸化反应	1
B. DNA 片段的末端平滑反应	2
C. 连接反应	2
1) 质粒载体插入 DNA 片段	2
2) 平末端线性 DNA 自身环化	2
3) 平末端载体 DNA 插入 Linker DNA	3
● 使用例	3
● 使用注意	4
● 关联产品	4

● 制品说明

DNA Blunting Kit 可使具有 3' 或 5' 突出末端的 DNA 平滑化。在 T4 DNA Polymerase 5' → 3' 的聚合酶活性和 3' → 5' 的外切酶活性的作用下，两种不同形式的粘性末端可被同时平滑化。再使用本试剂盒中的连接液即可高效地将得到的平末端 DNA 与平末端载体相连。并且反应液不需纯化，可以直接用于细菌转化和体外包装等。



本试剂盒也可将载体 DNA 的末端平滑化。经平滑化后的载体 DNA 再进行去磷酸化后使用。很多 PCR 产物都含有 3' -dA 末端，因而不能有效连入载体。如果使用本试剂盒将此类 PCR 产物末端平滑化，再根据实际情况进行磷酸化处理，就可以有效地连入平末端载体。

● 制品内容

T4 DNA Polymerase	20 μl
10× Buffer (含 dNTP)	30 μl
DNA Dilution Buffer	500 μl
(100 mM Tris-HCl < pH7.6, 16°C>, 5 mM MgCl ₂)	
Ligation Solution A*	2×600 μl
Ligation Solution B*	150 μl

*: Ligation solution A 和 B 与 DNA Ligation Kit Ver.1 (Code No. 6021)通用。

● 保存: -20°C

● 操作方法

A. 载体 DNA 的去磷酸化反应

为了提高插入 DNA 与载体 DNA 的连接效率，将载体 DNA 的 5' 末端进行去磷酸化处理后可以减少载体的自身环化。经限制酶切后的载体 DNA 即使已使用 T4 DNA Polymerase 平滑化，5' 端仍为磷酸化末端，因此，载体 DNA 需要按照下述方法用碱性磷酸酶进行去磷酸化处理。

1. 制备经限制酶完全切断的具有平滑末端的载体 DNA。乙醇沉淀精制 DNA。如果载体 DNA 是突出末端，可以按照 B.末端平滑化反应的步骤对载体末端进行平滑化处理，然后使用苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀的方法纯化 DNA，再使用灭菌水溶解沉淀备用。

2. 在微量离心管中制备下列反应液（总体积 150 μl ）。

试剂	使用量
Vector DNA（平滑末端）	<10 μg
10 \times Alkaline Phosphatase Buffer	15 μl
Bacterial Alkaline Phosphatase*(0.5–1.0 U/ μl)	2 μl
灭菌水	up to 150 μl

3. 65 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟。
 (*: 如果使用 CIAP 代替 BAP 时, 使用量为 2 μl CIAP(10–20 U/ μl), 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟。)
4. 加入 150 μl 的苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1), 充分混匀。
5. 离心, 取上层 (水层) 移至另一微量离心管中。
6. 重复 4. 5.操作。
7. 加入 15 μl 的 3 M 醋酸钠 (pH4.8–5.2)。
8. 加入 375 μl (2.5 倍体积) 的冷无水乙醇。–20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30–60 分钟。
9. 离心, 收集 DNA 沉淀。
10. 用 1 ml 的 70%冷乙醇清洗 DNA 沉淀后, 真空干燥。
11. 用 TE Buffer 溶解沉淀。如果 DNA 直接用于连接反应, 建议使用试剂盒中的 Dilution Buffer 溶解 DNA。

B. 末端平滑化反应

1. 在微量离心管中制备下列反应液（总体积 9 μl ）。

试剂	使用量
DNA 片段（粘性末端）*	0.1–10 pmol
10 \times Buffer	1 μl
灭菌水	up to 9 μl

* DNA 片段须经过乙醇沉淀。

2. 70 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 分钟, 然后转移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温。
3. 加入 1 μl 的 T4 DNA Polymerase, 轻柔混匀 (不可剧烈振荡)。
4. 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 分钟。保温时间很重要, 须准确。(GC 含量较低的 DNA, 则 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应。)
5. 如果 DNA 浓度很高, 加入 DNA Dilution Buffer, 使 DNA 浓度达到 1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$, 并激烈振荡, 使 T4 DNA Polymerase 失活, 然后置于冰上, 准备进行下一步反应。如果需要保存反应液, 则立即做苯酚处理、乙醇沉淀。DNA 沉淀用 DNA Dilution Buffer 溶解后于–20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

C. 连接反应

1. 向质粒载体中插入 DNA 片段

- 1) 制备 5–10 μl 用 DNA Dilution Buffer 溶解的平滑末端 DNA 片段和去磷酸化载体 DNA (约 50 ng)。DNA 片段的摩尔数须是载体 DNA 摩尔数的 5–10 倍。
- 2) 加入 4~8 倍体积 (20–80 μl) 的 Ligation Solution A, 均匀混合。
- 3) 加入 1 倍体积 (5–10 μl) 的 Ligation Solution B, 均匀混合。
- 4) 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟。
- 5) 将上述反应液 (20 μl 以下) 加入至 100 μl 的感受态细胞中进行转化。(如需进行电击转化, 请先进行 DNA 乙醇沉淀, 然后用适当的缓冲液或灭菌水溶解后再进行转化; 不可直接进行电击转化)。

2. 平末端线性 DNA 自身环化

操作过程参照 1.的方法。但要获得较高的分子内连接效率, 注意 DNA 浓度不要太高, 同时应尽可能

能减小连接反应液的体积，可以得到高效率的转化。

3. 向平滑末端载体中插入 Linker DNA

操作过程参照 1. 的方法。如果 Linker 富含 AT 或者短于 8 个碱基，连接反应应在 4-10°C 条件下进行 1-2 小时。

● 使用例

1. 末端平滑反应的效率检定

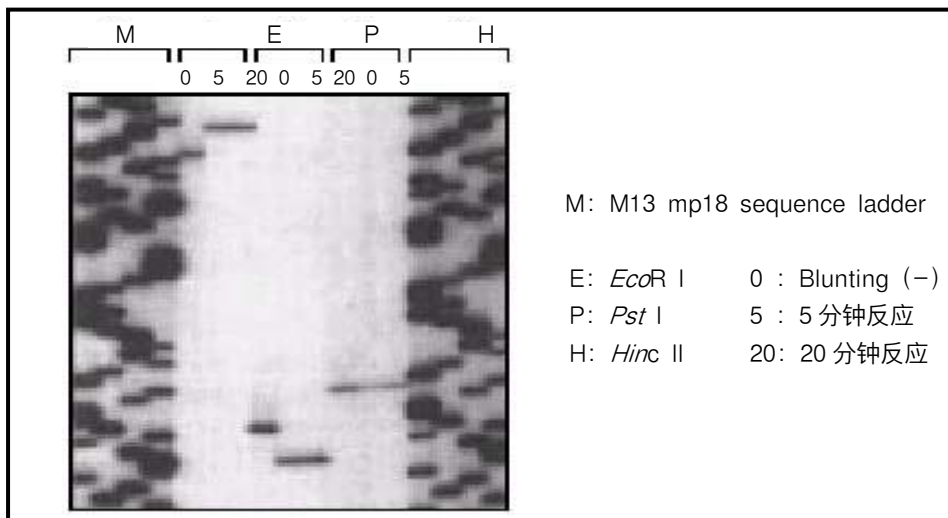
从能产生 5' 突出末端、3' 突出末端以及平滑末端的三种酶中任选一种，将质粒 DNA 线性化，再进行平滑化反应。如果对 5' 或 3' 突出末端质粒的平滑化反应是完全的，那么质粒环化后它原来的酶切位点将会改变。因此，连接液中的 DNA 将无法被相同的酶切断，而酶切和非酶切的样本转化效率差别不大。相比之下，平滑化反应对酶切后产生的平末端没有影响，因而环化后会重新形成原来的酶切位点，连接样本很容易被酶切，因而不会被转化。例如使用 *EcoR* I, *Pst* I 或 *Sma* I 酶切 pUC18 质粒 DNA (0.1 μl) 对试剂盒进行鉴定，使用 JM109 感受态细胞在含有 IPTG 的 X-gal 平板上培养，携带完整 pUC18 的转化菌落为蓝色，通过与白色菌落的对比可以检定末端平滑化的效率。

末端平滑化	其它处理	白色菌落数/ μg DNA		
		pUC18 <i>EcoR</i> I	pUC18 <i>Pst</i> I	pUC18 <i>Sma</i> I
-	-	<10 ²	<10 ²	<10 ²
-	连接	<10 ^{2*}	<10 ^{2*}	<10 ^{2*}
-	连接& 酶切	<10 ²	<10 ²	<10 ²
+	-	<10 ²	<10 ²	<10 ²
+	连接	0.7 × 10 ⁵	3.1 × 10 ⁵	<10 ^{2*}
+	连接 & 酶切	0.6 × 10 ⁵	4.1 × 10 ⁵	<10 ²

*: 包含蓝色菌落 > 10⁵

2. 凝胶电泳确认末端平滑结果

用 5' 末端 [³²P] 标记的引物，以单链噬菌体 DNA (M13 mp18: Code No. 3518) 为模板，利用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow Fragment 合成互补链，形成双链 DNA。然后分别用 *EcoR* I, *Pst* I 以及 *Hinc* II 进行酶切，再根据操作方法中 B 方案平滑化 5 或 20 分钟。经以上实验，并经放射自显影分析表明 (结果如下): 具有 5' 突出末端 (*EcoR* I 产生) 的 DNA 片段由于 5' → 3' 聚合酶反应而在凹陷的 3' 端进行碱基聚合形成平滑末端; 而具有 3' 突出端 (*Pst* I 产生) 的 DNA 片段的 3' 突出端由于 3' → 5' 外切酶活性被分解形成平滑末端; 原来的平滑末端 (*Hinc* II) 则不受任何影响。



3. PCR 产物的末端平滑及克隆

使用 PCR 法从 Tn903 (Oka *et al* 1981 *J.Mol.Biol.*147:217–226) 扩增卡那霉素抗性基因 (约 1.47 kb), 凝胶电泳分离, 使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250) 纯化。将卡那霉素抗性基因的 PCR 片段 (约 500 ng, 0.5 pmol) 末端平滑后, 与 pUC118/*Hinc* II (约 100 ng, 0.05 pmol) 按照 C 的方法连接 (总体积 60 μ l)。取连接液 20 μ l 转化 100 μ l 的 JM109 感受态细胞。磷酸化/去磷酸化 DNA (载体或 PCR 产物) 的检测如下。(注意, 使用磷酸化的载体 DNA, 其自身环化能力将会提高, 导致大量的蓝色菌落的生成。但是插入 PCR 片段的白色菌落的百分数将如下表所示一样高。)

处理方式		载体去磷酸化	转化效率 蓝色菌落/白色菌落 (菌落数/ μ g 载体 DNA)	卡那霉素 抗性克隆/白色菌落
PCR 产物				
末端平滑化	5' 末端磷酸			
-	-	-	$1.4 \times 10^6 / 1.8 \times 10^4$	0
+	-	-	$1.2 \times 10^6 / 3.2 \times 10^4$	64%
+	+	+	$6.0 \times 10^2 / 2.1 \times 10^4$	71%

*: 检定中感受态细胞转化效率为 $1.5 \times 10^7 / \mu$ g pUC118 DNA。

● 使用注意

1. 本试剂盒可使具有去磷酸化的 5' 突出末端的 DNA 末端平滑, 但不能使磷酸化的 3' 凹陷末端的 DNA 末端平滑。在鸟枪法克隆时, 应注意超声波分解的 DNA 片段, 可能会产生具有磷酸化的 3' 凹陷末端的 DNA 片段。
2. Ligation Solution A 和 B 置于冰中融解, 使用前快速混匀。
3. 做细菌转化时, 连接液不需要做苯酚抽提便可直接使用。如果有必要浓缩, 可用乙醇沉淀法精制 DNA。

● 关联产品

DNA Ligation Kit Ver.1 (Code No. 6021)
DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Code No. 6022)
DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (Code No. 6023)
E.coli JM109 Competent Cells (Code No. 9052)
E.coli DH5 α Competent Cells (Code No. 9057)
Alkaline Phosphatase (*E.coli* C75) (Code No. 2120A/B)
Alkaline Phosphatase (Calf intestine) (Code No. 2250A/B)
T4 Polynucleotide Kinase (Code No. 2021A/B)
T4 DNA Polymerase (Code No. 2040A/B)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)

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。

本文件由宝日医生物技术（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: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202002Da