

Code No. 6109

研究用

---

**TaKaRa**

DNA A-Tailing Kit

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 用 途	1
● 实验操作	1
● 使用 Blunting Control Insert 进行加“A”反应以及 TA 克隆的实验例	2
● 使用 A-Tailing Control Insert 进行 TA 克隆的实验例	3
● 使用注意	3
● Q&A	4

## ● 制品说明

DNA A-Tailing Kit是在平滑末端DNA片段的3'末端添加一个“A”尾的试剂盒，使用本制品可以使平滑末端的DNA片段进行TA克隆成为可能。与平滑末端的DNA片段克隆相比，TA克隆具有较高的克隆效率，可以大大提高实验的成功率。此外，本试剂盒中还含有A-Tailing Control Insert (500 bp) 和Blunting Control Insert (500 bp)，可以方便进行Control实验。

## ● 制品内容 (20次量)

A-Tailing Enzyme (5 U/μl)	10 μl
10×A-Tailing Buffer	100 μl
dNTP Mixture (each 2.5 mM)	80 μl
A-Tailing Control Insert* (50 ng/μl)	10 μl
Blunting Control Insert* (50 ng/μl)	50 μl

\* A-Tailing Control Insert和Blunting Control Insert各为5次使用量。

## ● 保存: -20°C

## ● 用途:

在平滑末端DNA片段的3'末端添加“A”尾后进行TA克隆。

## ● 实验操作

1. 末端平滑 DNA 片段的 3' 末端加“A”反应。

① 在微量离心管中配制下列加“A”反应液，全量为 50 μl。

试剂名称	使用量
10×A-Tailing Buffer	5 μl
dNTP Mixture	4 μl
A-Tailing Enzyme	0.5 μl
末端平滑 DNA 片段	0.5~5 μg
灭菌水	up to 50 μl

② 72°C反应 20 分钟。

③ 冰中静置 1~2 分钟。

2. A-Tailing DNA 片段与 T 载体的连接转化。

① 在微量离心管中配制下列 DNA 溶液，全量为 5 μl。

试剂名称	使用量
pMD18-T Vector*	1 μl
上述 1-③的 A-Tailing DNA 溶液	0.1~0.3 pmol
灭菌水	up to 5 μl

\* pMD18-T Vector 与 Code No. 6011 为同种制品，本 T 载体 1 μl (50 ng) 约为 0.03 pmol。

② 加入 5 μl (等量) 的 Solution I\*。

\* Solution I 是 Code No. 6022 DNA Ligation Kit Ver.2.1 的组份。

- ③ 16℃反应 30 分钟\*。
- \* 室温 (25℃) 也能正常进行连接反应, 但反应效率稍微降低。  
5 分钟也能正常进行连接反应, 但反应效率稍微降低。  
长片段 DNA (2 kb 以上) 进行克隆时, 连接反应时间请延长至数小时。
- ④ 全量 (10 μl) 加入至 100 μl JM109 感受态细胞中, 冰中放置 30 分钟。
- ⑤ 42℃加热 45 秒钟后, 再在冰中放置 1 分钟。
- ⑥ 加入 890 μl SOC 培养基, 37℃振荡培养 60 分钟。
- ⑦ 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养, 形成单菌落。计数白色、蓝色菌落。
- ⑧ 挑选白色菌落, 使用 PCR 法确认载体中插入片段的长度大小。

## ● 使用 Blunting Control Insert 进行加“A”反应以及 TA 克隆的实验例

### 1. Blunting Control Insert DNA 片段的 3' 末端加“A”反应。

- ① 在微量离心管中配制下列加“A”反应液, 全量为 50 μl。

试剂名称	使用量
10×A-Tailing Buffer	5 μl
dNTP Mixture	4 μl
A-Tailing Enzyme	0.5 μl
Blunting Control Insert	10 μl
灭菌水	up to 50 μl

- ② 72℃反应 20 分钟。
- ③ 冰中静置 1~2 分钟。

### 2. A-Tailing DNA 片段与 T 载体的连接转化。

- ① 在微量离心管中配制下列 DNA 溶液, 总量 5 μl。

试剂名称	使用量
pMD18-T Vector*1	1 μl
上述 1-③的 A-Tailing DNA 溶液	4 μl

- \* pMD18-T Vector 与 Code No. 6011 为同种制品, 本 T 载体 1 μl (50 ng) 约为 0.03 pmol。
- ② 加入 5 μl (等量) 的 Solution I\*。
- \* Solution I 是 Code No. 6022 DNA Ligation Kit Ver.2.1 的组份。
- ③ 16℃反应 30 分钟\*。
- \* 室温 (25℃) 也能正常进行连接反应, 但反应效率稍微降低。  
5 分钟也能正常进行连接反应, 但反应效率稍微降低。
- ④ 全量 (10 μl) 加入至 100 μl JM109 感受态细胞中, 冰中放置 30 分钟。
- ⑤ 42℃加热 45 秒钟后, 再在冰中放置 1 分钟。
- ⑥ 加入 890 μl SOC 培养基, 37℃振荡培养 60 分钟。
- ⑦ 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养, 形成单菌落。计数白色、蓝色菌落。
- ⑧ 挑选白色菌落, 使用 PCR 法确认载体中插入片段的长度大小。

### 3. 连接转化结果。

连接转化结果以及阳性克隆鉴定结果见下表。在本实验中使用的 *E.coli* JM109 Competent Cell 的转化效率为  $1.7 \times 10^8$  cfu/  $\mu$ g pUC19。

连接/转化效率 (cfu/ $\mu$ g Vector)		White(%)	阳性克隆率(%)
White	Blue		
$6.0 \times 10^5$	$3.0 \times 10^4$	95.0	90%以上

## ● 使用 A-Tailing Control Insert 进行 TA 克隆的实验例

### 1. A-Tailing Control Insert DNA 与 T 载体的连接转化。

① 在微量离心管中配制下列 DNA 溶液，全量为 5  $\mu$ l。

试剂名称	使用量
pMD18-T Vector*1	1 $\mu$ l
A-Tailing Control Insert*2	2 $\mu$ l
灭菌水	2 $\mu$ l

\*1 pMD18-T Vector 与 Code No. 6011 为同种制品，本 T 载体 1  $\mu$ l (50 ng) 约为 0.03 pmol。

\*2 A-Tailing Control Insert 1  $\mu$ l (50 ng) 的摩尔数约为 0.15 pmol。

② 加入 5  $\mu$ l (等量) 的 Solution I\*。

\* Solution I 是 Code No. 6022 DNA Ligation Kit Ver.2.1 的组份。

③ 16°C 反应 30 分钟\*。

\* 室温 (25°C) 也能正常进行连接反应，但反应效率稍微降低。

5 分钟也能正常进行连接反应，但反应效率稍微降低。

④ 全量 (10  $\mu$ l) 加入至 100  $\mu$ l JM109 感受态细胞中，冰中放置 30 分钟。

⑤ 42°C 加热 45 秒钟后，再在冰中放置 1 分钟。

⑥ 加入 890  $\mu$ l SOC 培养基，37°C 振荡培养 60 分钟。

⑦ 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养，形成单菌落。计数白色、蓝色菌落。

⑧ 挑选白色菌落，使用 PCR 法确认载体中插入片段的长度大小。

### 2. 连接转化结果。

连接转化结果以及阳性克隆鉴定结果见下表。在本实验中使用的 *E.coli* JM109 Competent Cell 的转化效率为  $1.7 \times 10^8$  cfu/  $\mu$ g pUC19。

连接/转化效率 (cfu/ $\mu$ g Vector)		White(%)	阳性克隆率(%)
White	Blue		
$8.8 \times 10^5$	$2.0 \times 10^4$	97.8	90%以上

## ● 使用注意

1. 为了提高加“A”反应效率，用于加“A”反应的末端平滑 DNA 片段应进行切胶回收的纯化处理，尽量避免引物等其它杂质的存在。切胶回收时可使用 Takara 凝胶回收试剂盒 (Code No. 9762)。

2. 使用 A-Tailing Control Insert 进行 TA 克隆时，可以检测使用的 T 载体是否质量可靠；使用 Blunting Control Insert 进行 TA 克隆实验时，可以检测本试剂盒的加“A”反应性能。
3. 按照本实验操作进行连接后，直接进行转化时的连接液不要超过 20  $\mu\text{l}$ 。当要转化的 DNA 量较大或准备进行电转化时，需对连接液进行乙醇沉淀，纯化 DNA 后再进行转化。进行乙醇沉淀时使用 Dr. GenTLE Precipitation Carrier (Code No. 9094) 可以提高 DNA 的回收率。
4. 使用高效连接液 Solution I 进行连接反应时请在 25 $^{\circ}\text{C}$  以下进行，温度升高 (>26 $^{\circ}\text{C}$ ) 较难形成环状 DNA。连接效率偏低时，可适当延长连接反应时间至数小时。

## ● Q&A

Q-1 怎样提高克隆效率？

- A-1
1. 为了提高加“A”反应效率，用于加“A”反应的末端平滑 DNA 片段应进行切胶回收的纯化处理，尽量避免引物等其它杂质的存在。切胶回收时可使用 Takara 凝胶回收试剂盒 (Code No. 9762)。
  2. 请使用转化效率大于  $10^8$  cfu/ $\mu\text{g}$  pUC19 DNA 的感受态细胞。
  3. DNA 片段的立体结构、DNA 片段的长短都会影响克隆效率。一般情况下，大片段 DNA 的克隆效率（连接效率与转化效率）偏低，此时可以延长连接反应时间，或采用电转化方法。
  4. 进行切胶回收纯化 DNA 片段时，不要使 DNA 片段在紫外线下暴露时间过长。
  5. Solution I 应尽量避免反复冻融。
  6. 建议使用新配制的平板培养基。

Q-2 转化后的菌落全为蓝色，但有目的 DNA 片段的插入，为什么？

A-2 插入的 DNA 片段较短（小于 500 bp），且插入片段没有影响 *LacZ* 基因的读框，此时平板培养基上出现的菌落有可能呈现蓝色（或淡蓝色）。

### 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](http://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。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686  
4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

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

v201702Da