

Code No. 6127A

研究用

TAKARA

Blunting Kination Ligation
(BKL) 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
● Takara BKL Kit 的原理	1
● 使用方法	2
A) 用 PCR 反应液直接进行克隆时	2
B) 用精制后的 DNA 片段进行克隆时	3
● 使用例	3
I) Control 实验	3
II) 不同长度的 DNA 片段的克隆	4
● 使用注意	4

● 制品说明

Blunting Kination Ligation (BKL) Kit 是一种能使 DNA 片段的末端平滑化、5' 端的磷酸化、DNA 片段和载体的连接等诸反应高效快速完成的试剂盒。使用本试剂盒时，DNA 片段的末端平滑化反应和 5' 端的磷酸化反应可在一个反应体系中同时进行，反应时间只需 10 分钟。此外，本试剂盒中还含有高效的 DNA 连接液，可在短时间内完成连接反应。

● 制品内容

1. 10X Blunting Kination Buffer	50	μl
2. Blunting Kination Enzyme Mix.	25	μl
3. Ligation Solution I *1	150	μl
4. Control Vector (pUC118 <i>Hinc</i> II/BAP; 50 ng/μl)	5	μl
5. Control Insert (200 ng/μl) *2	10	μl
6. ddH ₂ O	500	μl

*1 Ligation Solution I 即为 DNA Ligation Kit Ver.2.1 的一种组份。

*2 以 λ DNA 为模板，通过 *TaKaRa Taq* 反应扩增的 500 bp 的 PCR 片段。

● 保 存: -20℃

● 用 途

1. PCR 片段的克隆

使用大多数 DNA 聚合酶进行的 PCR 扩增的 DNA 片段，其 3' 端附加有一个“A”碱基，并且使用一般引物（非 5' 端磷酸化）进行 PCR 扩增时，其扩增的 DNA 片段的 5' 端都不带有磷酸基。因此，把此时 PCR 扩增的 DNA 片段和去磷酸化平滑末端载体进行连接时，其 PCR 产物必须进行末端平滑和 5' 末端的磷酸化处理。

2. DNA 片段文库的构建

使用本试剂盒可以对各种末端形状的 DNA 片段同时进行末端平滑化和 5' 端磷酸化处理，然后克隆到去磷酸化的末端平滑载体中。

3. 其他 DNA 片段的克隆。

● Takara BKL Kit 的原理

Takara BKL Kit 原理见图 1，以 PCR 片段的克隆为例，分以下三步。

1. 把 PCR 扩增片段进行末端平滑（Blunting）和 5' 端磷酸化（Kination）处理，可在同一个反应体系中进行。
2. 70℃热处理 5 分钟灭活 Blunting Kination Enzyme Mix。
3. 使用高效连接液 Ligation Solution I 把 DNA 片段和去磷酸化平滑末端载体连接。

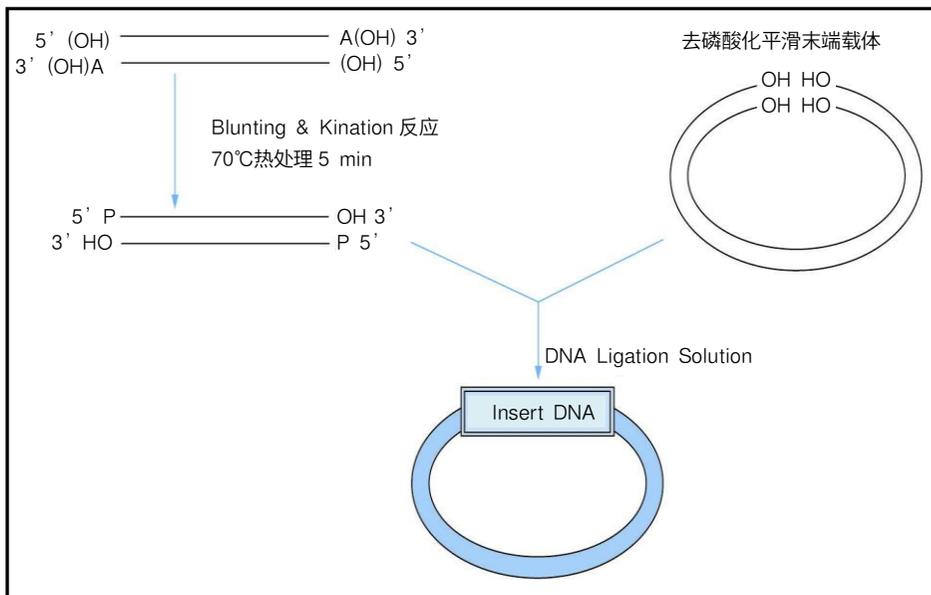


图 1. Takara BKL Kit 原理图

● 使用方法

A) 用 PCR 反应液直接进行克隆时

■ Blunting Kination 反应

1. 在微量离心管中配制下列反应液。

试剂	使用量
PCR 反应液	2 μ l
10 \times Blunting Kination Buffer	2 μ l
Blunting Kination Enzyme Mix	1 μ l
ddH ₂ O	15 μ l

2. 37°C反应 10 分钟。

3. 70°C热处理 5 分钟。

■ Ligation 反应

4. 取 3. 的溶液 5 μ l 到另一个新的微量离心管中。

5. 加入 1 μ l 经过去磷酸化处理的平滑末端载体 DNA (50~100 ng/ μ l), 混合均匀。

6. 加入 6 μ l 的 Ligation Solution I, 混合。

7. 16°C反应 1 小时。

8. 全量转化 100 μ l 的感受态细胞。

注) 1. 用电刺激法做细菌转化时, 先用乙醇沉淀或苯酚抽提等方法置换 DNA 溶解缓冲液后再进行电转化。

2. PCR 产物中混有非特异性 DNA 时, 可以通过琼脂糖凝胶电泳回收目的 DNA 片段。

3. PCR 反应液最适用量为 2 μ l, 用量过多会降低反应效率。如需提高 DNA 用量请用乙醇沉淀法精制 DNA 片段后再进行反应。

B) 用精制后的 DNA 片段进行克隆时

■ Blunting Kination 反应

1. 在微量离心管中配制以下反应液。

试剂	使用量
DNA Fragment	0.2~20 pmol
10×Blunting Kination Buffer	2 μl
Blunting Kination Enzyme Mix	1 μl
ddH ₂ O	up to 20 μl

2. 37°C反应 10 分钟。
3. 70°C热处理 5 分钟。

■ Ligation 反应

4. 取 3.的溶液 5 μl 到另一个新的微量离心管中。
5. 加入 1 μl 经过去磷酸化处理的平滑末端载体 DNA (50~100 ng/μl), 混合均匀。
6. 加入 6 μl 的 Ligation Solution I, 混合。
7. 16°C反应 1 小时。
8. 全量反应液用于转化 100 μl 的感受态细胞。

注) 1. 用电刺激法做细菌转化时, 先用苯酚抽提和乙醇沉淀等方法置换 DNA 溶解缓冲液后再进行电转化。

2. 插入 DNA 与载体 DNA 的摩尔数比应为 2: 1~10: 1。

● 使用例

1) Control 实验

1. 在微量离心管中配制以下反应液。

试剂	使用量
Control Insert	2 μl
10×Blunting Kination Buffer	2 μl
Blunting Kination Enzyme Mix	1 μl
ddH ₂ O	15 μl

2. 37°C反应 10 分钟。
3. 70°C热处理 5 分钟。
4. 连接反应。

试剂	使用量
3.的溶液	5 μl
Control Vector (pUC118 <i>Hinc</i> II/BAP)	1 μl
Ligation Solution I	6 μl

5. 16°C反应 1 小时。
6. 全量反应液转化 100 μl 的 JM109 Competent Cell。
7. 在含有 Amp、IPTG、X-Gal 的平板培养基上培养。

在使用转化效率为 1.0×10^8 Colonies/ μg pUC118 DNA 的 JM109 Competent Cell 时, 50 ng 的载体可得到约 $2 \sim 8 \times 10^3$ 个白色菌落。由于 Control Insert 的两个末端的序列为 $5' -\text{GAC} \cdots \text{GTC} -3'$, 所以当其正确地插入到载体后, 又可恢复 *Hinc* II 的酶切位点序列, 因此插入片段可以被 *Hinc* II 再切出来。

II) 不同长度的 DNA 片段的克隆

以 λ DNA 为模板, 使用 *TaKaRa Taq* 进行 PCR 反应扩增 200 bp、500 bp、1,000 bp、1,500 bp、2,000 bp 的 DNA 片段, 再分别按照前述的使用方法进行末端平滑化、磷酸化反应后, 克隆到去磷酸化的 pUC118 DNA 的 *Hinc* II 位点上, 然后再转化 *E.coli* JM109 Competent Cell, 利用颜色选择培养基选择克隆体。此外, 把 1,000 bp、1,500 bp、2,000 bp 的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳回收 DNA 片段后, 再取等量的 DNA 片段进行了同样的实验, 并比较了两者的结果。

结果: A) 直接使用 PCR 反应液进行连接反应时:

插入 DNA 链长 (bp)	白色菌落数/蓝色菌落数 (/50 ng pUC118 DNA)	含插入 DNA 克隆体/白色菌落
200	$6.2 \times 10^4 / 6.0 \times 10^3$	9/10
500	$4.7 \times 10^4 / 5.6 \times 10^3$	9/10
1,000	$2.5 \times 10^4 / 4.6 \times 10^3$	10/10
1,500	$1.2 \times 10^4 / 4.2 \times 10^3$	8/10
2,000	$1.2 \times 10^4 / 6.8 \times 10^3$	6/10

B) 使用纯化后的 DNA 片段进行连接反应时:

插入 DNA 链长 (bp)	白色菌落数/蓝色菌落数 (/50 ng pUC118 DNA)	含插入 DNA 克隆体/白色菌落
1,000	$4.1 \times 10^4 / 5.0 \times 10^3$	9/10
1,500	$2.3 \times 10^4 / 4.0 \times 10^3$	10/10
2,000	$1.2 \times 10^4 / 4.0 \times 10^3$	8/10

- * 本实验所用的 JM109 Competent Cell 的转化效率为 7.0×10^8 Colonies/ μg pUC118。
- * 利用 PCR 法确认是否含有插入 DNA 片段。
- * PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收后, 克隆效率有所提高。

● 使用注意

- 1) Ligation Solution I 请于冰中融解, 使用前混匀。应避免多次反复冻融。
- 2) 连接转化效率低时, 请试用下述方法进行改进。
 - ① 确认感受态细胞的转化效率。
 - ② 延长连接反应时间至过夜反应。
 - ③ 连接反应后向溶液中加入 NaCl 使其终浓度为 500 mM, 再做细菌转化。
 如果以上操作仍不能改善连接效率, 则需对连接后的 DNA 进行纯化。
- 3) 当使用具有 *lacZ* 基因的载体克隆短链 DNA 片段时, 有时即使插入了 DNA 片段也会有不出现终止密码或者阅读框不改变的情况发生, 在颜色选择培养基上形成淡蓝色的单菌落。
- 4) 短链 DNA 克隆时, 有时会有插入内含数个串联 DNA 片段的克隆体出现。
- 5) 如果 PCR 反应过程中需要加入矿物油, 则要注意勿将其带入后面的反应液中。
- 6) 带有磷酸基的 3' 凹陷末端的 DNA 片段无法使用本试剂盒进行末端平滑化反应。

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。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>