

基因克隆实验手册

★ 基本的连接反应～定向克隆 ★

目录

基因克隆实验（操作流程）

- 限制性内切酶 / 连接反应
- TA克隆
- In-Fusion克隆

cDNA合成

核酸纯化

琼脂糖凝胶电泳



基因克隆实验指南

将目的DNA片段（靶序列）插入到任意载体中的基因克隆操作是基因工程实验的基本技术之一，目前也广泛应用于各种研究领域中。

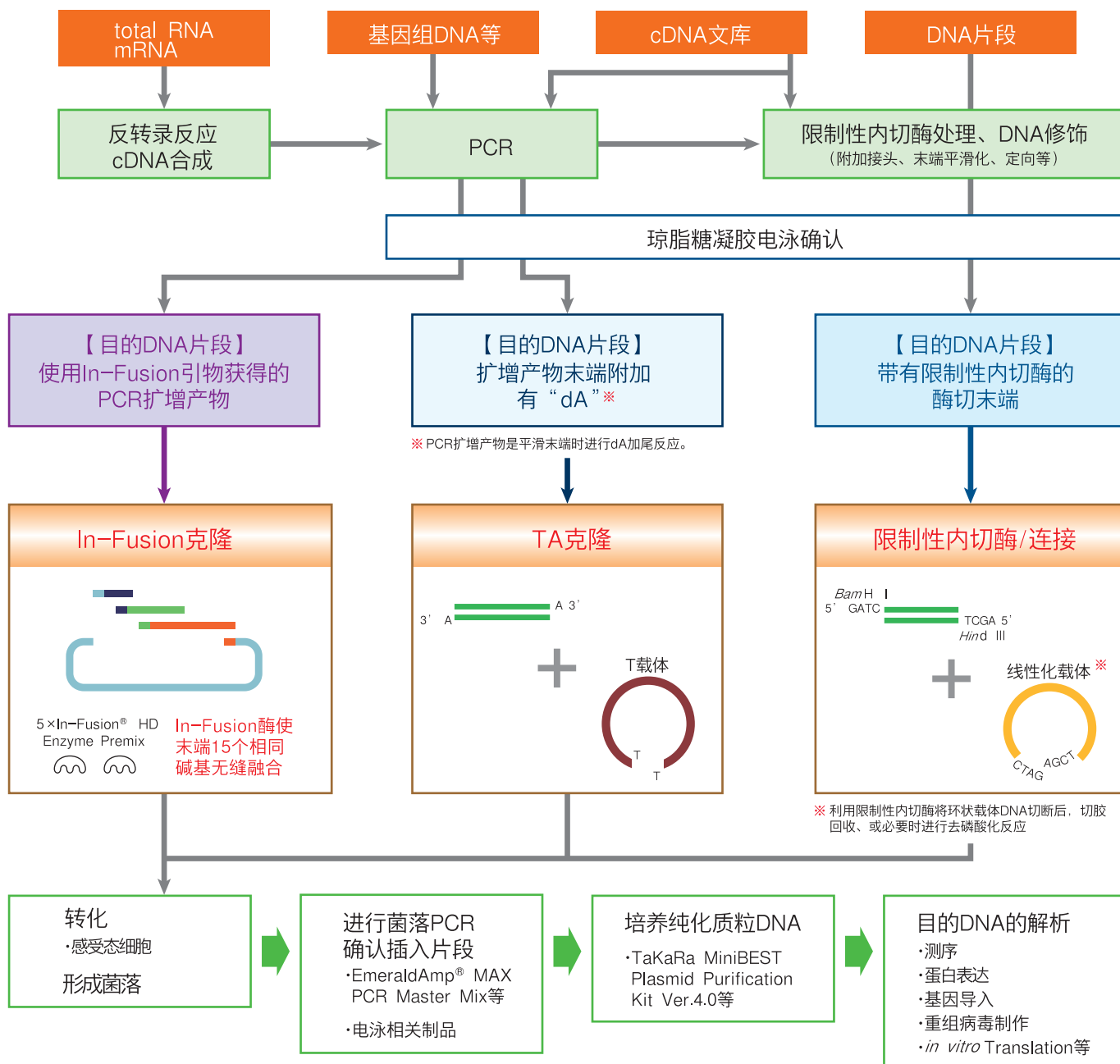
限制性内切酶的发现和应用使基因克隆成为一种广泛性的实验手法，但近年来无需使用限制性内切酶处理的TA克隆法及In-Fusion法的开发可随心所欲的进行基因克隆。

另外，基因克隆时，从检测样品中提取和纯化基因组DNA及RNA、mRNA的反转录反应合成cDNA、PCR反应扩增DNA片段等也是获得目的DNA的非常重要的操作环节。

本实验手册对使用限制性内切酶的传统克隆法、广泛使用的TA克隆法及新的克隆法In-Fusion克隆进行基因克隆时所必需的各种实验操作（DNA纯化、cDNA合成、菌落PCR等）的操作方法概要进行介绍。

【克隆实验手册】中所记载的内容对基因克隆初学者和具有一定经验的研究人员会有所帮助，希望大家随时使用。

基因克隆操作的基本流程



■ 制备插入DNA片段和载体

克隆方法	插入DNA片段的末端形状	载体制备
限制性内切酶/连接	需要在DNA片段的两端形成限制性内切酶识别位点。利用不同的限制性内切酶的酶切位点可决定插入DNA片段的插入方向。	根据DNA片段的两末端进行相应的限制性内切酶处理。酶切后必要时进行纯化及去磷酸化处理。
TA克隆	使用3'端附加“dA”的PCR酶进行PCR反应、或需要在平滑末端的扩增产物中进行“dA”加尾反应。不能决定插入片段的插入方向。	利用市面上销售的3'末端附加有dT的载体。
In-Fusion克隆	利用在引物末端附加与载体末端相同的15个碱基序列进行目的基因的扩增。	可使用任意载体。仅需限制性内切酶处理或PCR扩增使载体线性化。

■ 根据使用目的推荐的克隆用试剂盒

实验目的	推荐使用的试剂盒	产品信息
<p>想进行连接反应</p>  <p>快速·高效率地连接</p> <p>平滑末端的连接</p> <p>大片段插入片段 (> 10 kb) 的连接</p>	<p>DNA Ligation Kit <Mighty Mix></p> <p>Blunting Kination Ligation (BKL) Kit</p> <p>TaKaRa DNA Ligation Kit LONG</p>	<p>P4</p> <p>P6</p> <p>P4</p>
<p>想进行TA克隆</p>  <p>插入片段的3'端附加有“dA”碱基</p> <p>插入片段为平滑末端需要附加dA碱基</p>	<p>Mighty TA-cloning Kit</p> <p>Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®</p>	<p>P6</p> <p>P6</p>
<p>想快速、高效地进行基因克隆</p> <p>想一次克隆多个DNA片段</p> <p>想进行定性克隆</p> <p>想在没有酶切位点的位置插入DNA片段</p> <p>因为是表达载体，不想附加多余碱基序列</p> 	<p>In-Fusion® HD Cloning Kit</p> <p>无缝融合相同序列后，可简单的进行目的基因的PCR片段的克隆</p> <ul style="list-style-type: none"> 可在任意载体的任何位点插入DNA片段 不附加任何多余序列 In-Fusion反应仅需15分钟 克隆效率高 可插入几个DNA片段及长链DNA片段 	<p>P8</p>

利用限制性内切酶 / 连接进行基因克隆

将目的DNA片段插入到目的载体质粒的基因克隆操作是基因工程实验的基本操作方法。
这里对使用限制性内切酶和T4 DNA连接酶 (DNA Ligation Kit) 的基因克隆操作进行说明。

操作方法概要

1. 准备插入DNA片段 (制备目的DNA片段)

(a) 使用限制性内切酶切割DNA片段

首先确认目的DNA片段的限制性内切酶的酶切位点, 然后根据载体质粒的克隆位点选择限制性内切酶。

★使用Takara Cut-Site Navigator (下一页) 非常方便。

例: 使用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I 进行双酶切

① 配制反应液

底物DNA	(≤1 μg)
<i>Hind</i> III	1 μl
<i>Bam</i> H I	1 μl
10 × K Buffer	2 μl
灭菌水	up to 20 μl (轻弹混合)

② 37°C反应1小时

③ 取一半反应液 (10 μl左右) 加入Loading Buffer后进行琼脂糖凝胶电泳, 确认酶切反应。

④ 切胶回收目的DNA片段。

★为避免DNA的损伤, 减少UV照射时间。

⑤ 使用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 纯化切胶回收的DNA (切胶回收DNA的操作方法请参考第10页)

⑥ 回收液作为插入DNA片段溶液 [A]。

(b) PCR反应扩增DNA片段

利用与载体连接的限制性内切酶酶切位点的5' 端附加的引物进行插入DNA片段的PCR扩增。

※限制性内切酶酶切位点 + 5' 端3个以上碱基

Tks Gflex™ DNA Polymerase使用例

① PCR

2 × Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	25 μl
Forward Primer	0.2~0.3 μM (final conc.)
Reverse Primer	0.2~0.3 μM (final conc.)
模板DNA	< 500 ng
Tks Gflex DNA Polymerase	1.25 U
灭菌水	up to 50 μl (轻弹混合)

94°C 1 min.	} 30 cycles
↓	
98°C 10 sec.	
60°C 15 sec.	
68°C 30 sec./kb	

② PCR扩增产物的纯化

使用TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0等进行PCR扩增产物的纯化 (参考第10页)。

③ 利用限制性内切酶酶切反应对PCR扩增产物的两端进行酶切处理 (必要时可增加反应体积)

上述纯化后的PCR产物	≤2 μl
<i>Hind</i> III	1 μl
<i>Bam</i> H I	1 μl
10 × K Buffer	2 μl
灭菌水	up to 20 μl (轻弹混合)

④ 37°C反应1小时

⑤ 使用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0等纯化回收 (参考第10页)。

⑥ 回收液作为插入DNA片段溶液 [A]。

2. 准备载体质粒

① 使用限制性内切酶在目的载体质粒 (环状) 的克隆位点进行酶切反应【载体的线性化】

载体质粒DNA	(≤1 μg)
<i>Hind</i> III	1 μl
<i>Bam</i> H I	1 μl
10 × K Buffer	2 μl
灭菌水	up to 20 μl (轻弹混合)

② 37°C反应1小时

③ 使用TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0等纯化反应液 (参考第10页)。

④ 回收液作为质粒DNA溶液 [B]。

⚠ 使用一种限制性内切酶制备插入DNA片段和载体质粒的线性化时, 为避免载体的自连应进行下面的载体的去磷酸化处理。

去磷酸化处理 (防止自连)

限制性内切酶处理后的载体	1~20 pmol
Alkaline Phosphatase (BAP)	0.3~0.6 U
10 × Alkaline Phosphatase Buffer	5 μl
灭菌水	up to 50 μl (轻弹混合)

37~65°C反应30分钟

苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 提取 (2次)

氯仿/异戊醇 (24: 1) 提取 (1次)

乙醇沉淀

溶解于TE Buffer (20 μl以下), 作为质粒DNA溶液 [B]。

★ 5'-端突出末端去磷酸化处理使用CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) 即可, 平滑末端及3'-端突出末端去磷酸化处理建议使用BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase)。

3. 插入DNA片段与线性化质粒的连接

使用DNA Ligation Kit (Mighty Mix) 时

插入DNA片段溶液 [A]	25~250 fmol
质粒DNA溶液 [B]	50 ng (25 fmol)
Ligation Mix	7.5 μ l
灭菌水	up to 15 μ l

↓
16°C、反应30分钟 (或25°C反应5分钟)

4. 转化

使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells时

①使用前在冰上将100 μ l HST08感受态细胞融化后轻轻混合, 移至14 ml圆底Tube中 (不可振荡混合)。

↓
②加入10 μ l连接反应后的反应液、在冰中放置30分钟

↓
③42°C反应45秒后, 在冰中放置1~2分钟

↓
④加入已预先37°C保温的SOC培养基, 使终体积为1 ml。

↓
⑤37°C振荡培养1小时 (160~225 rpm)

↓
⑥取适量涂布于LB选择培养基、37°C过夜静置培养

5. PCR扩增确认插入片段DNA

6. 培养、纯化质粒

PCR扩增确认插入片段DNA请参考第5页

! 常见问题

【Q1】难以连接, 转化效率低时的注意点有哪些?

【A1】

- 请延长连接反应时间。
 - DNA溶液的盐浓度偏高会导致连接效率下降。特别是乙醇沉淀时使用的醋酸铵对连接反应有抑制作用, 乙醇沉淀时要充分清洗, 进行除盐处理。
 - 使用DNA提取试剂盒时, 对提取液进行乙醇沉淀后交换缓冲液可提高连接效率。
 - 进行突出末端的连接时, 将DNA溶液 (载体+插入片段DNA) 在60~65°C加热2~3分钟后冰中急冷, 再加入Ligation Kit中的各试剂进行连接反应。确保突出末端的连接可提高转化效率。
- 以上操作不能改善连接效率时建议重新纯化DNA。

【Q2】长链DNA克隆时的注意点有哪些?

【A2】DNA链越长, 连接效率越低。

TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (Code No. 6024) 适用于长链DNA片段的连接, 对10 kb以上的长片段DNA的连接特别有效。

另外, 连接有插入DNA片段的较大质粒 (特别是10 kb以上的质粒) 使用大肠杆菌转化时, 转化效率低且质粒在大肠杆菌内的稳定性低, 产生有缺失克隆的可能性高。建议使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (Code No. 9128) 可提高大片段DNA的转化效率。

Takara Bio网站上的限制性内切酶识别序列检索工具

! Takara Cut-Site Navigator

只要输入DNA碱基序列, 即可显示切断位点及模式图和详细的碱基序列。



【关联产品】

	产品名	包装量	Code No.
限制性内切酶、去磷酸化处理	<i>Hind</i> III	10,000 U	1060A
	<i>Bam</i> H I	10,000 U	1010A
	Alkaline Phosphatase (<i>E. coli</i> C75)	50 U	2120A
	Alkaline Phosphatase (Calf intestine)	1,000 U	2250A
PCR	Tks Gflex™ DNA Polymerase	250 U	R060A
连接、转化	DNA Ligation Kit Ver.2.1	1Kit (100 次)	6022
	DNA Ligation Kit < Mighty Mix >	1 Kit	6023
	TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	1 Kit	6024
	<i>E. coli</i> HST08 Premium Competent Cells	1 Set (100 μ l \times 10)	9128
	<i>E. coli</i> JM109 Competent Cells	1 Set (100 μ l \times 10)	9052
纯化DNA	TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0	50 次量	9761
	TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0	50 次量	9762
质粒纯化	TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0	50 次量	9760
电泳	Agarose Regular	50 g	5260
	100 bp DNA Ladder (Dye Plus)	100 次量	3422A
	λ - <i>Hind</i> III digest	100 μ g	3403

TA克隆

使用Taq DNA Polymerase等PCR酶获得PCR扩增产物的3'端都附有一个“dA”碱基。TA克隆是使用3'端附有一个“dT”碱基的T载体，与一个3'端有一个“dA”碱基的PCR扩增产物进行连接的简便的克隆方法。（插入DNA片段5'端不需要去磷酸化处理）

操作方法概要

1. 准备插入DNA片段（制备目的DNA片段）

① PCR扩增（使用TaKaRa Ex Taq®）

10 × Ex Taq Buffer (Mg ²⁺ plus)	5 μl
dNTP Mixture (各2.5 mM)	4 μl (各200 μM)
Forward Primer	0.2~1 μM (final conc.)
Reverse Primer	0.2~1 μM (final conc.)
模板DNA	< 500 ng
TaKaRa Ex Taq	1.25 U
灭菌水	up to 50 μl (轻弹混合)

98°C	10 sec.	} 30 cycles
55°C	30 sec.	
72°C	1 min./kb	

★使用PrimeSTAR®等α型PCR酶时，需注意3'端不附有“dA”碱基（参考下一页）

② 利用琼脂糖凝胶电泳确认扩增的目的DNA片段。

③ 使用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0等纯化DNA，除去PCR反应液中残留的引物及盐（参考第10页）。

④ 回收液作为插入DNA片段溶液。

2. 与T载体的连接

使用Mighty TA-cloning Kit时

① 在新的Tube中配制下面的反应液。

灭菌水	3 μl
pMD20-T Vector	1 μl (50 ng)
PCR扩增产物 (插入DNA片段溶液)	1 μl

② 加入5 μl Ligation Mighty Mix后轻轻混合

③ 16°C反应30分钟。

3. 转化

使用E. coli HST08 Premium Competent Cells时

① 使用前在冰上将100 μl HST08感受态细胞融化后轻轻混合，移至L4ml圆底Tube中（不可振荡混合）。

② 加入10 μl连接反应后的反应液、在冰中放置30分钟

③ 42°C反应45秒后，在冰中放置1~2分钟

④ 加入已预先37°C保温的SOC培养基，使终体积为1 ml。

⑤ 37°C振荡培养1小时（160~225 rpm）

⑥ 取适量涂布于LB选择培养基（LB + Amp + X-Gal）、37°C过夜静置培养

⑦ 蓝/白筛选，挑选白色菌落。

★使用E. coli JM109时涂布于LB选择培养基（LB + Amp + X-Gal+IPTG），37°C过夜培养后进行蓝/白筛，挑选白色菌落。

4. PCR扩增确认插入DNA片段

使用EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix时

① 在新的Tube中配制下面的反应液。

EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (2 × Premix)	25 μl
Forward Primer	0.2 μM (final conc.)
Reverse Primer	0.2 μM (final conc.)
灭菌水	up to 50 μl

② 用枪头挑取菌落，悬浮于上述PCR反应液后进行PCR扩增反应。

98°C	10 sec.	} 30 cycles
60°C	30 sec.	
72°C	1 min./kb	

③ 取部分PCR反应液进行琼脂糖凝胶电泳，确认插入DNA片段。

5. 培养、质粒纯化

① 挑取已确认含有目的质粒的菌落、加入到2 ml LB + Amp培养基中，过夜振荡培养。

② 使用TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0等纯化质粒DNA。（纯化操作参照第10页）

★纯化后的质粒DNA构造最好进行限制性内切酶酶切处理和琼脂糖凝胶电泳确认。

! PCR酶种类及末端形状

PCR用 DNA 聚合酶大体分为两种类型。以 *Taq* DNA Polymerase 为首的 Pol I 型 (family A) DNA 聚合酶和以 Pfu DNA Polymerase 为代表的 α 型 (family B) DNA 聚合酶。

Pol I 型 DNA 聚合酶与在 Pol I 型基础上改良的 DNA 聚合酶 (*TaKaRa Ex Taq*® 等) 的扩增产物 3' 端都附加有一个 “dA”。因此 PCR 扩增产物可直接用于 TA 克隆。

而 α 型 DNA 聚合酶具有很强的 3' → 5' exonuclease 活性, PCR 扩增产物为平滑末端, 不可直接用于 TA 克隆。平滑末端的 PCR 扩增产物进行 TA 克隆时, 需在 3' 端附加 “dA” 碱基。

Takara Bio 公司不仅提供普通 TA 克隆试剂 [Mighty TA-cloning Kit], 还为您准备了 α 型 DNA 聚合酶扩增产物专用 TA 克隆试剂 [Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®]。

本试剂盒中含有用于在平滑末端的 PCR 扩增产物 3' 端附加 “dA” 碱基的 A-overhang mixture, 可简便地进行 TA 克隆。

PCR酶类型	Pol I型 (family A)	α 型 (family B)
扩增产物的 3' 端形状	附加 “dA” 碱基 (可进行 TA 克隆)	平滑末端
酶名称	<i>TaKaRa Ex Taq</i> ® <i>TaKaRa LA Taq</i> ® <i>TaKaRa Taq</i> ™ MigythAmp® 系列 EmeraldAmp® MAX SapphireAmp® SpeedSTAR®	PrimeSTAR® 系列 Tks Gflex™

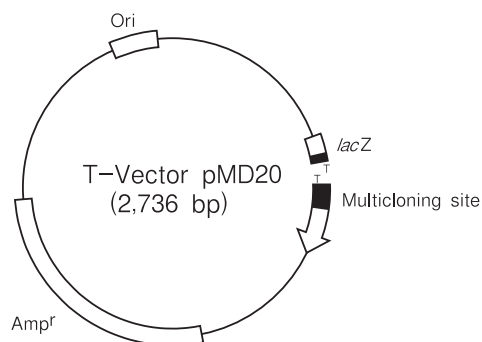
! T载体

除 TA-cloning Kit 外, 本公司还销售 pMD™18-T Vector Cloning Kit、pMD™19-T Vector Cloning Kit、T-Vector pMD20 和 T-Vector pMD19 (Simple) 4 种载体。这几种载体转化后都可以进行蓝 / 白筛选。T-Vector pMD19 (Simple) 是 pUC19 来源的消除了多克隆酶切位点的载体, 便于克隆后利用插入 DNA 片段上的酶切位点进行酶切反应。

! 5 kb 以上 PCR 扩增产物的克隆

因 5 kb 以上的长链 PCR 扩增产物的 TA 克隆效率低, 建议进行平滑末端的克隆。使用含有末端平滑化及磷酸化处理试剂的 Blunting Kination Ligation (BKL) Kit (Code No. 6127A) 便于 5 kb 以上 PCR 扩增产物进行克隆。

使用 PrimeSTAR® 系列等 α 型 DNA 聚合酶获得的平滑末端的 PCR 扩增产物, 磷酸化后进行平滑末端克隆时, 也请使用 Blunting Kination Ligation (BKL) Kit。



【相关产品一览表】

	产品名	包装量	Code No.
TA 克隆试剂盒及 T 载体	Mighty TA-cloning Kit	20 次量	6028
	Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®	20 次量	6019
	T-Vector pMD20	1 μ g	3270
	T-Vector pMD19 (Simple)	1 μ g	3271
	pMD™18-T Vector Cloning Kit	20 次量	6011
	pMD™19-T Vector Cloning Kit	20 次量	6013
平滑末端克隆试剂盒	Blunting Kination Ligation (BKL) Kit	20 次量	6127A
转化用感受态细胞	<i>E. coli</i> HST08 Premium Competent Cells	1 Set (100 μ l \times 10)	9128
	<i>E. coli</i> JM109 Competent Cells	1 Set (100 μ l \times 10)	9052
	<i>E. coli</i> DH5 α Competent Cells	1 Set (100 μ l \times 10)	9057
PCR 扩增确认插入 DNA 片段	EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix	160 次量	RR320A
纯化 DNA	TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0	50 次量	9761
	TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0	50 次量	9762
质粒纯化	TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0	50 次量	9760
电泳	Agarose Regular	50 g	5260
	100 bp DNA Ladder (Dye Plus)	100 次量	3422A
	λ Hind III digest	100 μ g	3403

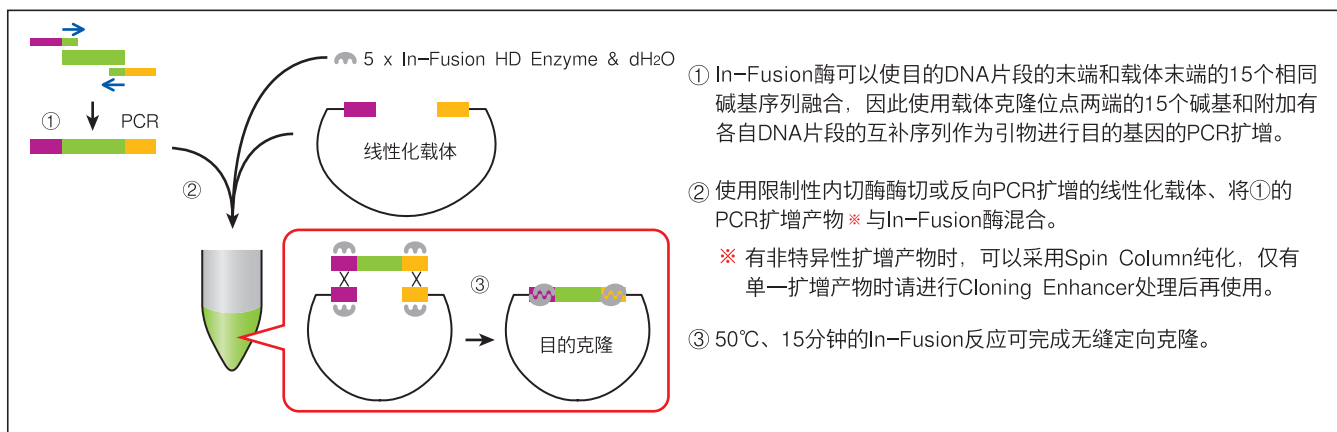
★各 PCR 酶请在 Takara Bio 的网站上确认。

In-Fusion克隆

Clontech的In-Fusion酶使目的DNA片段的末端与载体末端具有15个相同碱基序列无缝融合后进行克隆。In-Fusion克隆可利用任意载体的末端序列进行克隆，具有可使用任意载体的、不附加多余序列的、可进行定向克隆等优点。

原理和特点

- 无需选择插入DNA片段种类、克隆位点和载体的定向克隆
- 可高效克隆短链及长链DNA (50 bp~15 kb)
- 一次反应可同时进行多片段克隆
- 仅需15分钟即可完成In-Fusion反应



操作方法概要

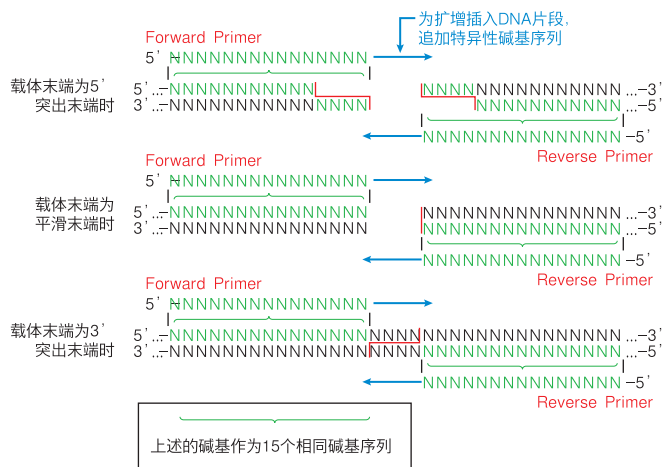
(操作流程详见说明书)

1. 线性化载体和插入DNA片段的制备

① 确定载体和克隆位点后，利用限制性内切酶酶切或反向PCR进行载体的线性化。

…线性化载体溶液 [A]

② 设计In-Fusion Primer。



In-Fusion酶可以识别目的DNA片段的末端和载体末端的15个相同碱基序列并使其融合。因此在进行插入DNA片段的PCR扩增反应时，最重要的一点是在特异性引物的5'端附加与使用的线性化载体末端相同的15个碱基。请按照上图所示的线性化载体的末端形状设计In-Fusion Primer。另外，In-Fusion Cloning反应不受有无PCR扩增产物的A-overhang的影响，因此不必考虑PCR扩增产物的A-overhang。

In-Fusion Primer设计请利用在线工具 ⇒⇒

③ PCR扩增插入DNA片段。
(使用PrimeSTAR® Max DNA Polymerase时)

PrimeSTAR Max Premix (2 ×)	25 μl
Forward Primer	0.2~0.3 μM
Reverse Primer	0.2~0.3 μM
Template	< 200 ng
Sterile deionized H ₂ O	up to 50 μl

98°C	10 sec.	} 30~35 cycles
55°C	5 sec. or 15 sec.	
72°C	5 sec./kb	

便利的在线工具

In-Fusion克隆用引物设计工具、实验例介绍、各种实验指南、学习工具等可利用信息。

<http://www.takara-bio.co.jp/infusion-tool/>



2. 琼脂糖凝胶电泳确认PCR扩增产物

①根据电泳结果对插入DNA片段进行如下处理。

- 有非特异性扩增产物时：
切胶回收目的片段，使用TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0进行Spin Column纯化。

- 仅有单一扩增产物时建议进行Cloning Enhancer处理：

PCR反应液	5 μ l
Cloning Enhancer	2 μ l

37°C 15分钟	→	80°C 15分钟
-----------	---	-----------



②插入DNA片段溶液 [B]。

3. In-Fusion Cloning反应

5 × In-Fusion HD Enzyme Premix	2 μ l
线性化载体 [A]	x μ l
纯化后 / CE处理后的PCR扩增片段 [B]	y μ l
dH ₂ O	up to 10 μ l

50°C、15分钟	→	冰上静置
-----------	---	------

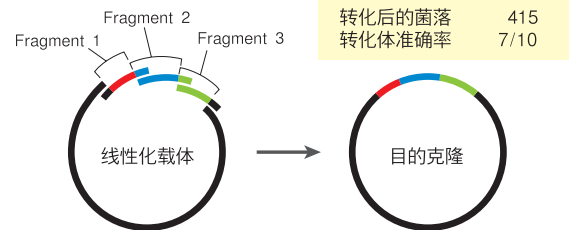
4. 大肠杆菌转化

建议使用Stellar™ Competent Cells (Code No. 636763) 及 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (Code No. 9128) 等，质粒DNA转化效率在 1×10^8 cfu/ μ g以上的感受态细胞。

5. PCR扩增确认插入DNA片段、培养、质粒纯化

PCR扩增确认插入DNA片段参照第5页，质粒纯化参照第10页

! 多个DNA片段的克隆



使用In-Fusion Cloning可有效用于多个DNA片段的克隆。使用In-Fusion® HD Cloning Kit分别对1 kb的DNA片段进行克隆，利用菌落PCR对插入DNA片段进行了确认，10个克隆中有7个克隆准确的插入了DNA片段。

【相关制品一览表】 10次量 (EcoDry™型: 8次量)

制品名称	Code No.	试剂盒附属品				说明
		Cloning Enhancer	纯化用Column NucleoSpin	Stellar Competent Cell	CloneAmp HiFi PCR Premix	
In-Fusion® HD Cloning Kit ※	639648	—	—	—	—	建议使用Takara Bio的高保真性酶 (PrimeSTAR系列) 的用户使用
In-Fusion® HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer ※	639633	●	—	—	—	
In-Fusion® HD Cloning Kit w/NucleoSpin® ※	639639	—	●	—	—	
In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit ※	639689	—	—	—	—	
In-Fusion® HD Cloning Plus ※	638909	—	●	●	●	请初次使用 In-Fusion Kit, 特别是希望使用all in one (即用型) 的用户使用
In-Fusion® HD Cloning Plus CE ※	638916	●	—	●	●	

※ Premix型In-Fusion® HD除上述包装量外，还有50次量和100次量的包装。

※ In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit是一种冻干型 (可在室温、干燥器内保存) 的In-Fusion® HD试剂盒。已分装于microtube中，可立即使用。还有24次量型 (8联管×3) 和96次量型 (96孔板)。



〈In-Fusion® HD附带制品〉

Cloning Enhancer

PCR扩增产物是单一PCR产物时，In-Fusion反应时对单一扩增产物进行前处理的试剂。通过Cloning Enhancer处理，使In-Fusion酶不受PCR反应中使用的引物、模板和dNTP的影响，可发挥最大反应性能。

TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0

PCR扩增有多个产物时，切胶回收的DNA使用Spin Column纯化。

Stellar™ Competent Cells

是高转化效率的感受态细胞。对于大片段质粒DNA也可获得高转化效率。与具有同样基因型的其他感受态细胞相比，菌落形成速度快。进行pUC系列的质粒转化时，利用 β -半乳糖苷酶的 α -互补性，添加X-Gal后可对重组体进行蓝白筛选。

CloneAmp™ HiFi PCR Premix

保真性高的PCR酶。In-Fusion克隆时适用于插入DNA片段的扩增及通过PCR反应进行载体的线性化。本产品中附带In-Fusion® HD Cloning Plus系列。

反转录酶 & cDNA合成

纯化后的RNA进行RT-PCR及制作文库时，首先需要使用反转录酶 (Reverse Transcriptase: RTase) 合成cDNA。这里介绍使用PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit合成cDNA时的一般操作流程。

目前作为研究用试剂普遍使用的反转录酶有avian myeloblastosis virus (AMV) 来源的和moloney murine leukemia virus (M-MLV) 来源的2种反转录酶。过去为了避免受到mRNA高级结构的影响，使用耐热性的AMV RTase，但近年来由于MMLV来源的改良型反转录酶 (PrimeScript™ 系列等) 反应性能的提高、逐渐成为反转录酶的主流。

使用反转录酶合成cDNA时，以RNA上的反应起始位置为引物进行退火，引物根据不同使用目的可分为以下3种。

1. Oligo dT primer: 在 mRNA的polyA tail退火，从3' 端开始合成cDNA。
2. Random primer (一般为6个碱基-9个碱基左右): 可对 mRNA、rRNA等所有RNA cDNA进行cDNA合成。
3. 已知序列的特异性primer: 只能合成特定的cDNA。

操作方法概要

合成1st strand cDNA

使用PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit时

①在Microtube中配制下面的模板RNA/Primer混合液。

Oligo dT Primer (50 μM)	1 μl
(or Random 6 mers (50 μM))	1 μl
(or Gene Specific Primer)	2 pmol
dNTP mixture (10 mM each)	1 μl
模板RNA	total RNA: ≤ 5 μg (or polyA RNA: ≤ 1 μg)
RNase free dH ₂ O	up to 10 μl

②65℃反应5分钟后，冰中急冷。

③加入下面的反应液，使终体积为20 μl。

上述模板RNA/Primer Mixture	10 μl
5 × PrimeScript II Buffer	4 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.5 μl
PrimeScript II RTase (200 U/μl)	1 μl
RNase free dH ₂ O	up to 20 μl

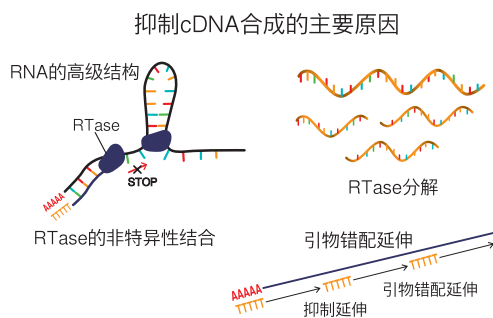
④轻轻混合。

⑤按照下面的反应条件进行反应。

(30℃ 10 min.) ※使用Random 6 mers时需要
42℃ 30~60 min.

⑥95℃反应5分钟后，冰中急冷。

克服了cDNA合成的抑制原因



合成cDNA时，RNA的高级结构及分解、RTase自身与RNA的非特异性结合、冰上放置对延伸的抑制等是cDNA合成过程中经常遇到的问题。PrimeScript™ II RTase是在具有良好反应性能的反转录酶PrimeScript™ 中添加了辅助蛋白质后，克服了这些抑制cDNA合成的主要原因。

PrimeScript™
RTase

- ☑ 适用于高级结构的RNA
- ☑ 42℃反应条件下抑制RNA的损伤

+

辅助蛋白质

- ☑ 抑制RTase自身与RNA的非特异性结合
- ☑ 抑制冰上放置对延伸的阻害

【相关制品一览表】

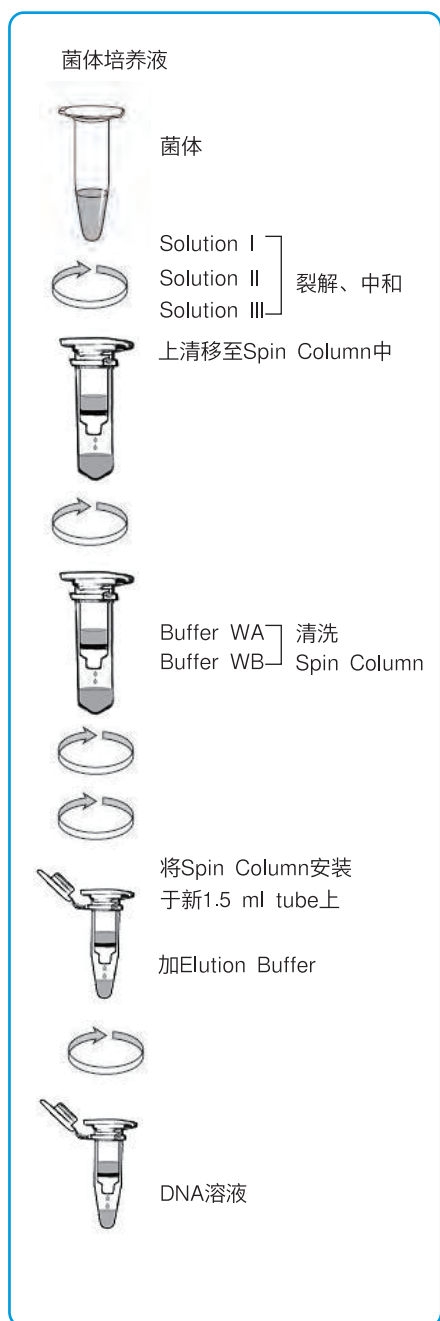
	制品名称	包装量	Code No.
建议用于合成高品质的1st strand cDNA	PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit	50 次量	6210A
与高保真PCR酶配套使用的RT-PCR Kit	PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit	50 次量	R023A

核酸纯化

为了除去PCR反应后的引物、切胶回收DNA、质粒DNA纯化、基因克隆等各种场合使用Spin Column型核酸纯化试剂盒可快速、简便的进行高纯度DNA的提取。这里介绍使用SpinColumn纯化DNA的方法。

操作方法概要

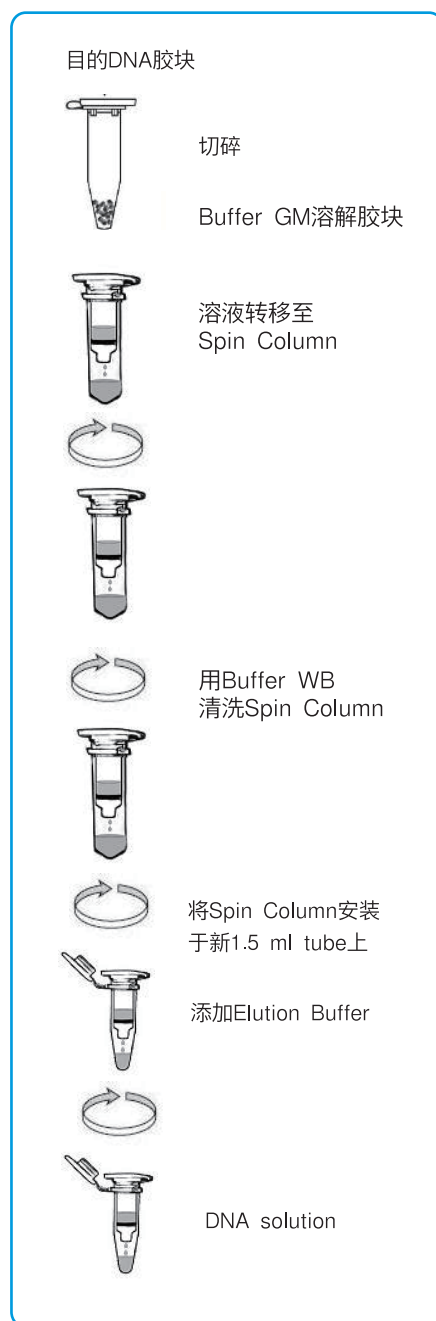
质粒DNA纯化



PCR扩增产物纯化



切胶回收DNA纯化



【相关制品一览表】

	制品名称	包装量	Code No.
制备质粒DNA	TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0	50 次量	9760
扩增产物纯化	TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0	50 次量	9761
切胶回收DNA	TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0	50 次量	9762

琼脂糖凝胶电泳

DNA的检出和定量是基因克隆实验不可缺少的实验操作。其中利用琼脂糖凝胶电泳进行DNA的检出是常用的实验方法之一。这里主要介绍琼脂糖凝胶的制作方法。

操作方法概要

1. 琼脂糖凝胶的制作 (制作150 ml 1%琼脂糖凝胶)

- ①量取1.5 g琼脂糖粉末。
- ②在适当的容器中*1 加入150 ml室温或冷却的缓冲液*2, 边搅拌边加入琼脂糖粉末。(称量容器和溶液的重量并做好记录。)
- ③盖上保鲜膜后, 扎几个小孔以便排出蒸汽, 放入微波炉中加热。加热期间混合几次, 使琼脂糖完成溶解*3。
- ④加热结束后从微波炉中取出, 轻轻搅拌均匀后排出气泡。(必要时再次称量重量、用加热的蒸馏水补充蒸发掉的水分。)
- ⑤室温放置冷却至50~60°C, 倒入已插入梳子的制胶槽中。用枪头排气泡后使琼脂糖冷却凝固。
- ⑥拔出梳子后移到电泳槽中。(不马上使用时, 放入装有缓冲液的容器后阴凉处保存。)

2. 准备电泳样品

在电泳样品中加入1/10量的10 × Loading Buffer后充分混合。DNA分子量Maker也进行同样的准备。将样品加入凝胶的样品孔中。

3. 电泳

启动电泳仪(电源)的开关后开始电泳。注意电流方向(电泳槽上部为阴极、下部为阳极)。电泳至适当位置时切断电源。

4. 凝胶染色

电泳后将凝胶浸泡在溴化乙锭(EtBr)等染色液中。

- *1 也可使用三角瓶, 使用溶液量2~5倍的烧杯以防止液体突然沸腾溢出。制作3%以上的高浓度琼脂糖凝胶时, 建议使用更大的容器。
- *2 制作3%以上的高浓度琼脂糖凝胶时, 琼脂糖粉末不容易悬浮于缓冲液中, 预先将缓冲液在冰中冷却10分钟左右, 易于琼脂糖粉末的悬浮。
- *3 微波炉加热时, 要注意容器过热会发生剧烈的沸腾。为防止烫伤请使用holder或隔热手套。

【相关制品一览表】

	制品名称	凝胶类别	DNA/RNA片段分离范围	凝胶化温度(°C)	包装量	Code No.
各种琼脂糖	Agarose Regular	标准凝胶	500~20K	35~37	50 g	5260
	Agarose D-1 LE	标准凝胶	500~20K	36 ± 1.5	50 g	5261
	Agarose D-5	标准凝胶	500~40K	36 ± 1.5	50 g	5262
	Agarose F.P.DNA	标准凝胶	500~20K	36 ± 1.5(1%)	25 g	5263
	Agarose LM GQT	低熔点凝胶	500~20K	24~28	25 g	5264
	Agarose LM SIEVE	低熔点凝胶	10~1K	< 35	25 g	5265
	Agarose MS-6	标准凝胶	40~1K	< 35	25 g	5266

	制品名称	概要	包装量	Code No.
缓冲液	Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50 × Powder, pH8.3	将1包粉末溶解于蒸馏水制备成1L的50 × TAE Buffer	1包	T9131
	Tris-Borate-EDTA Buffer (TBE) Powder, pH8.3	将1包粉末溶解于蒸馏水制备成1L的TBE Buffer	10包	T9121

	制品名称	包装量	Code No.
Marker	DL2,000 DNA Marker	约100 次	3427A
	DL5,000 DNA Marker	约100 次	3428A
	DL15,000 DNA Marker	约100 次	3582A
	DL10,000 DNA Marker	约100 次	3584A
	D L500 DNA Marker	约100 次	3590A
	DL1,000 DNA Marker	约100 次	3591A
	λ-Hind III digest	100 μg	3403

	制品名称	包装量	Code No.
	20 bp DNA Ladder (Dye Plus)	100 次	3420A
	50 bp DNA Ladder (Dye Plus)	100 次	3421A
	100 bp DNA Ladder (Dye Plus)	100 次	3422A
	200 bp DNA Ladder (Dye Plus)	100 次	3423A
	250 bp DNA Ladder (Dye Plus)	100 次	3424A
	500 bp DNA Ladder (Dye Plus)	100 次	3425A
	1 kb DNA Ladder (Dye Plus)	100 次	3426A
	λ-Eco T14 I digest	100 μg	3401

- 本宣传页上登载的制品, 都是以科研为目的。请不要用于其它方面, 如: 不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可, 严禁产品的转售· 转让、以转售· 转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可及注册商标信息请在本公司网站上确认: <http://www.takarabiomed.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及制品名称即使没有特殊标注, 使用的也是各公司的商标或注册商标。

宝日医生物技术(北京)有限公司 Takara Biomedical Technology (Beijing) Co., Ltd.

技术咨询电话: 4006518761 4006518769
E-mail: service@takarabiomed.com.cn

Ver.4 2018年4月制作

