Takara基因克隆产品选择指南

that's GOOD science!

基因克隆操作的基本流程

total RNA
mRNA

基因组DNA等

cDNA文库

DNA片段

反转录反应
cDNA合成

PCR

限制性内切酶处理、DNA修饰
（附加接头、末端平滑化、定向等）

琼脂糖凝胶电泳确认

【目的DNA片段】
使用In-Fusion引物获得的
PCR扩增产物

【目的DNA片段】
扩增产物末端附加
有“dA”※

※PCR扩增产物是平滑末端时进行
dA加尾反应。

【目的DNA片段】
带有平滑末端

【目的DNA片段】
带有限制性内切酶的
粘性酶切末端

In-Fusion克隆

5×In-Fusion® HD
Enzyme Premix

In-Fusion酶使
末端15个相同
碱基无缝融合

★ 新一代克隆方法，高效快速；
★ 无需亚克隆，可直接克隆至表达载体；
★ 多片段“一步”克隆；
★ 无缝克隆，不添加冗余序列。

TA克隆

3’ A　A 3’

T载体

T　T

3’端带有A尾的片段与商业化的
T载体克隆

平末端连接

5’ P　3’ OH
3’ OH　5’ P

去磷酸化平滑末端载体

OH　HO
OH　HO

5 kb以上PCR产物的TA克隆效率
较低，建议进行平末端克隆；高保
真PCR获得的平滑末端产物，也可
磷酸化后进行平末端克隆。

粘性末端连接

*Bam*H I
5’ GATC

TCGA 5’
*Hin*d III

线性化载体※

CTAG　AGCT

限制酶酶切后产生粘性末端或平滑
末端加接头后，使用连接酶连接的
传统克隆方法

※利用限制性内切酶将环状载体DNA切断后，
切胶回收、或必要时进行去磷酸化反应。

转化
·感受态细胞
形成菌落

进行菌落PCR
确认插入片段

培养纯化质粒DNA

目的DNA的解析
·测序
·蛋白表达
·基因导入
·重组病毒制作
·*in vitro* Translation等