Code No. 6019

研究用

TaKaRa

Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®

说明书

v201702Da

目　　录

内　容	页码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 试剂盒以外所需试剂	1
● 保　　存	1
● pMD20-T vector	1
● 使用注意事项	2
● 实验操作	2
● Control 反应	3
● 相关产品	4

● 制品说明

使用 *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 反应，扩增获得的 PCR 产物 3’端附有一个“A”碱基。利用 3’端附有“A”碱基的 PCR 产物进行克隆时，与含有 3’-T 末端的载体通过 T-A 碱基互补配对原则进行克隆，此种方法被称为 T-A 克隆。Mighty TA-cloning Kit (Code No. 6028)是在短时间内快速地将 PCR 产物进行 T-A 克隆的试剂盒。连接反应使用 DNA Ligation Kit<Mighty Mix>，操作简便，可在短时间内高效地进行连接反应。但使用 PrimeSTAR 系列的α型 DNA 聚合酶进行 PCR 反应时，因酶本身具有极强的 3’→5’ Exonuclease 活性，扩增产物几乎都为平滑末端，不能直接进行 TA 克隆。PrimeSTAR 系列 DNA 聚合酶的 PCR 产物进行 TA 克隆时，3’端必须添加“A”碱基。

本试剂盒中含有（A-overhang mixture），可简单地对 PrimeSTAR 系列 DNA 聚合酶的 PCR 产物 3’端添加“A”碱基。A-overhangmixture 与 MightyTA-cloning Kit 配套使用，是 PrimeSTAR 系列 DNA 聚合酶 PCR 扩增产物的 TA 克隆专用试剂。

● 制品内容（20 次量）

Mighty TA-cloning Kit	
pMD20-T vector (50 ng/μl)	20 μl
Ligation Mighty Mix*1	50 μl × 2
Positive Control Insert*2	10 μl
A-overhang mixture	
A-overhang enzyme	10 μl
10 × Buffer	20 μl
dATP	10 μl

*1: Ligation Mighty Mix 与 DNA Ligation Kit<Mighty Mix> (Code No. 6023)是同一种试剂。

*2: 3’端带有 A 碱基约 200 bp DNA 片段。(以 *E.coli* 基因组 DNA 为模板，使用 *TaKaRa Ex Taq*® 进行 PCR 反应得到的扩增产物。)（10 ng/μl）

● 试剂盒以外所需试剂

- PCR 扩增产物回收、纯化用试剂（参考实验操作）
- Competent cell 或 ElectroCell（*E. coli*）
- SOC 培养基
- 含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板

● 保　　存:　-20℃

● pMD20-T vector

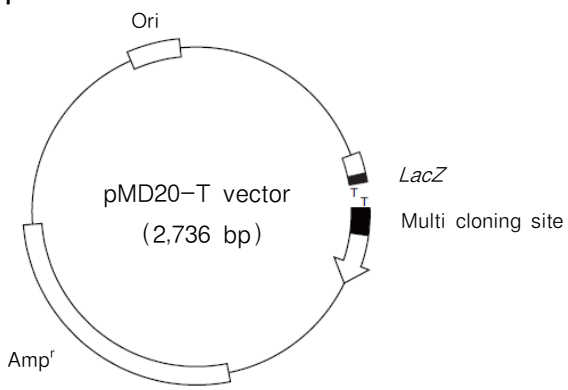

图 1. pMD20-T 载体图谱

图 2. pMD20-T 的多克隆位点

● 使用注意事项

1. Ligation Mighty Mix 在冰上融解，轻轻混合后再使用。
2. 克隆时，根据插入片段的长度和方向，有时即使插入了 DNA 片段也会有不出现终止密码或读码框不改变的情况发生，在蓝白选择培养基上会形成淡蓝色菌落。出现这种现象时，建议进行菌落 PCR 确认插入片段。
3. 进行切胶回收纯化 DNA 片段时要避免 UV 照射时间过长。长时间照射，DNA 会受到损伤，影响克隆效率。
4. 当 PCR 扩增用质粒模板与克隆载体（pMD20-T vector；具有 Amp^r）有同样的选择标记基因时，为防止出现质粒模板自身的转化菌落，建议切胶回收扩增片段后再进行克隆。

● 实验操作

（1）目的片段的扩增和精制

使用 PrimeSTAR HS DNA Polymerase、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase、PrimeSTAR Max DNA Polymerase 和 Tks Gflex™ DNA Polymerase 进行目的片段的 PCR 扩增，取少量扩增后反应液进行电泳确认。

- 扩增产物为单一条带时，可以通过苯酚/氯仿抽提、乙醇沉淀进行纯化。还可以使用 QuickClean™ Enzyme Removal Resin（Code No. 631770）*纯化扩增产物。再进行步骤（2）的 3’末端加“A”反应。

  *：使用 QuickClean Enzyme Removal Resin 时，请按照下面的操作流程进行 DNA 纯化。

  1. 充分悬浮 QuickClean Enzyme Removal Resin。
  2. 将 PCR 反应液移至 1.5 ml 离心管中，加入 1/10 量的 QuickClean™ Enzyme Removal Resin，充分振荡混合 10～20 秒。
  3. 10,000 rpm 离心 1 分钟，将上清液移至新的 1.5 ml 离心管中。（注意：吸取上清液时，不要混入 QuickClean Enzyme Removal Resin）。
  4. 回收上清液后，重复操作步骤 1～3。上清液作为 DNA 回收液进行步骤（2）的 3’末端加“A”反应。

- 当扩增产物中有引物二聚体或非特异性扩增产物时，要切胶回收目的片段。此时，可以使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（Code No. 740609.10/.50/.250）等试剂盒纯化目的片段。然后再进行步骤（2）的 3’末端加“A”反应。

（2）加“A”反应

1. 在微量离心管中按照下列组份配制反应液后充分混合

回收的 DNA 溶液	8 μl
10×Buffer	1 μl
dATP	0.5 μl
A-overhang enzyme	0.5 μl
Total	10 μl

2. 65℃反应 10 分钟。
3. 反应液用于步骤（3）的连接反应。

[注意]：加“A”反应后，尽量立即进行连接反应。

（3）连接反应

1.取 1 μl[*1] 加“A”后 PCR 产物到新的 microtube 中。
2. 加入 1 μl pMD20-T vector 和 3 μl[*1] 灭菌水，混匀。

*1：可适当调整添加量。只要 PCR 产物和灭菌水总体积是 4 μl 即可。

3. 加入 5 μl Ligation Mighty Mix，轻轻混匀。
4. 16℃保温 30 分钟。
5. 全量加入至 100 μl Competent cells[*2] 中进行转化。

需要进行电转化时，要进行酚氯仿抽提和乙醇沉淀纯化，置换缓冲液后再进行转化。

*2：可以使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells、*E. coli* JM109 Competent Cells。（使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells 时，不需要添加 IPTG）。

6. 涂布于含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板[*3]。

*3：可使用 SOC 培养基适当稀释后，再涂布于数个 LB 平板上。

7. 37℃过夜培养，通过蓝/白菌落筛选挑选出白色菌落。

（4）插入片段的确认

采用菌落 PCR 方法可简单、快速地检测大肠杆菌重组质粒中的插入片段。

使用 pMD20-T vector 的一对引物 M13 primer M4 和 M13 primer RV，M13 primer M4、M13 primer RV 与 EmeraldAmp PCR Master Mix 或 SapphireAmp Fast PCR Master Mix 配套使用，可快速确认有无插入片段。

【实验例】

使用 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 扩增获得 2 kb 扩增产物（单一条带），按照本试剂盒的操作流程，在 3’末端加“A”与 pMD20-T vector 进行连接反应后，使用 *E. coli* JM109 Competent Cells（Code No. 9052）转化时，形成约 1×10^3 阳性菌落。

● Control 反应

1. 取 1 μl Positive Control Insert 加入到新的 microtube 中。
2. 加入 1 μl pMD20-T vector 和 3 μl 灭菌水后混匀。
3. 加入 5 μl Ligation Mighty Mix，轻轻混匀。
4. 16℃反应 30 分钟。
5. 全量加入至 100 μl Competent cells[*1] 中进行转化。

需要进行电转化时，要进行酚氯仿抽提和乙醇沉淀纯化，更换缓冲液后再进行转化。

*1：可以使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells、*E. coli* JM109 Competent Cells。（使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells 时，不需要添加 IPTG）。

6. 涂布于含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板。

7. 37℃过夜培养，通过蓝/白菌落筛选挑选出白色菌落*2。

*2：使用转化效率为 1×10^8 菌落/μg pUC119 DNA 的 *E. coli* JM109 Competent Cells 时，50 ng 载体可获得 $1\sim5\times10^4$ 个白色菌落。

● 相关产品

Mighty TA-cloning Kit（Code No. 6028）
Reagent Set for Mighty Cloning Kit（Blunt End）（Code No. 6027）
T-Vector pMD20（Code No. 3270）
E. coli HST08 Premium Competent Cells（Code No. 9128）
E. coli HST08 Premium Electro-Cells（Code No. 9028）
E. coli JM109 Competent Cells（Code No. 9052）
E. coli JM109 Electro-Cells（Code No. 9022）
QuickClean™ Enzyme Removal Resin（Code No. 631770）
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（Code No. 740609.10/.50/.250）
M13 Primer M4（Code No. 3832A/B）
M13 Primer RV（Code No. 3830A/B）

＜PCR 酶＞
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase（Code No. R010A/B）
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase（Code No. R050A/B）
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase（Code No. R045A）
Tks Gflex™ DNA Polymerase（Code No. R060A/B）

＜检测插入 DNA 片段用＞
EmeraldAmp® PCR Master Mix（Code No. RR300A/B）
EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix（Code No. RR300A）
SapphireAmp® Fast PCR Master Mix（Code No. RR350A/B）

PrimeSTAR，*TaKaRa Ex Taq*，EmeraldAmp，and SapphireAmp are regestered trademarks of TAKARA BIO INC.
Tks Gflex is a trademark of TAKARA BIO INC.

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: http://www.takara.com.cn

v201702Da