

Code No. 6028

研究用

---

**TAKARA**

Mighty TA-cloning Kit

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 试剂盒以外所需试剂	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	3

## ● 制品说明

使用 *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 反应，扩增得到的 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 是在短时间内快速地将 PCR 产物进行 TA 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完成连接反应。

## ● 制品内容 (20 次量)

pMD20-T vector (50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ g (20 $\mu$ l)
Ligation Mighty Mix* <sup>1</sup>	50 $\mu$ l $\times$ 2
Positive Control Insert* <sup>2</sup>	10 $\mu$ l

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

\*2: 在 3' 端带有“A”突出端的 DNA 片段 (约 200 bp)。(以 *E. coli* 基因组 DNA 为模板，使用 *TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> 进行 PCR 反应获得的扩增产物) (10 ng/  $\mu$ l)

## ● 保存

-20°C

## ● 试剂盒以外所需主要试剂

- Competent cell 或 Electro Cell (*E. coli*)
- SOC 细菌培养基
- 含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板

## ● pMD20-T vector

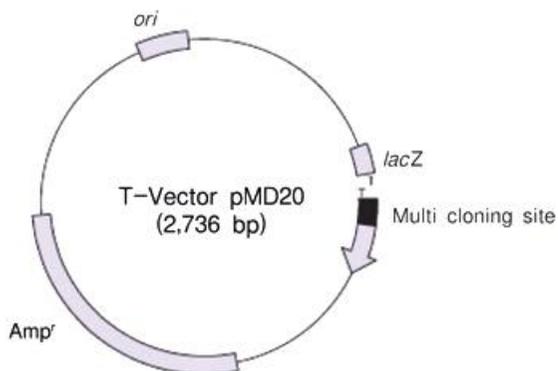


图 1. pMD20-T 载体图谱

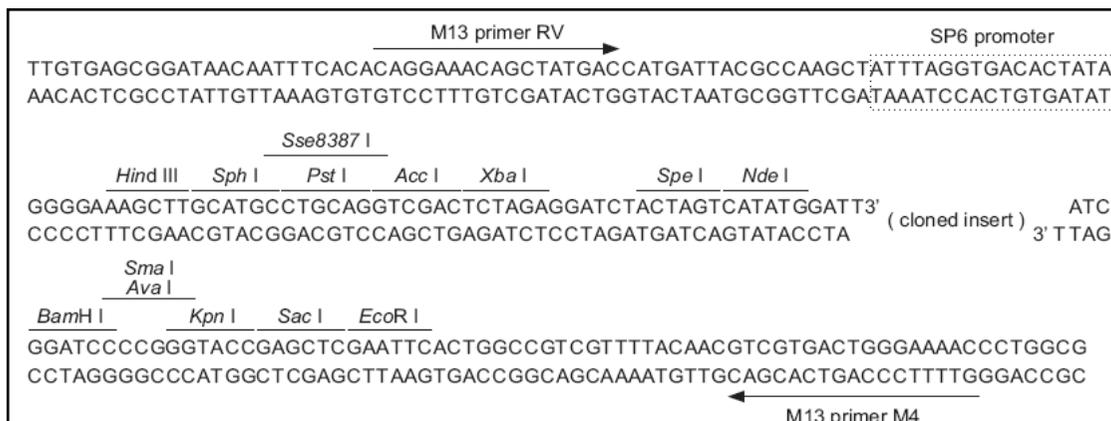


图 2. pMD20-T 的克隆位点

## ● 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. PCR 用模板质粒与克隆载体 (pMD20-T vector; Amp<sup>r</sup>) 有同样的选择标记基因时，为防止出现模板质粒自身的转化菌落，将 PCR 反应液凝胶电泳后回收目的片段，纯化后再进行克隆。

## ● 实验操作

### (1) 目的基因的扩增、纯化

使用 Terra™ PCR Direct Polymerase Mix、*TaKaRa Taq*<sup>™</sup>、*TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa Ex Taq* Hot Start Version、*TaKaRa LA Taq*<sup>®</sup>、SpeedSTAR™ HS DNA Polymerase 进行 PCR 反应扩增目的基因。取部分反应液进行电泳确认。

- ① 扩增产物为单一条带时，直接进行 (2) 的连接反应。
- ② 扩增产物中有引物二聚体时，可以使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250) 等试剂盒进行简单的 DNA 纯化后再进行 (2) 的连接反应。
- ③ 扩增产物中有非特异性扩增时，电泳后切胶回收目的 DNA 片段。可以使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250) 等试剂盒回收片段，回收 DNA 后再进行 (2) 的连接反应。

### (2) 连接反应

1. 取 1 μl 上述 PCR 产物\*<sup>1</sup> 到新的 microtube 中。
2. 加入 1 μl pMD20-T vector 和 3 μl 灭菌水\*<sup>1</sup>，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°C 反应 30 分钟。
5. 全量加入至 100 μl Competent cells\*<sup>2</sup> 中进行转化。

使用电穿孔法进行转化时，需经酚氯仿抽提和乙醇沉淀纯化，置换缓冲液后再进行转化。

- \* 2: 请使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells、*E. coli* JM109 Competent Cells。  
(使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells 时，不需要使用 IPTG)。

- 涂布于含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板\*<sup>3</sup>。  
\* 3: 可使用 SOC 培养基适当稀释后再涂布于数个 LB 培养基平板上。
- 37°C 过夜培养, 通过蓝/白菌落筛选挑选出白色菌落。

### (3) 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<sup>®</sup> PCR Master Mix 或 SapphireAmp<sup>®</sup> Fast PCR Master Mix 配套使用, 可快速确认有无插入片段。

## ● Control 反应

- 在新的微量离心管中加入 1 μl Positive Control Insert。
- 加入 1 μl pMD20-T vector 和 3 μl 灭菌水后混匀。
- 加入 5 μl Ligation Mighty Mix, 轻轻混匀。
- 16°C 反应 30 分钟。
- 全量加入至 100 μl Competent cells\*<sup>1</sup> 中进行转化。  
使用电穿孔法进行转化时, 需经酚氯仿抽提和乙醇沉淀纯化, 置换缓冲液后再进行转化。  
\* 1: 请使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells、*E. coli* JM109 Competent Cells。  
(使用 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells 时, 不需要使用 IPTG)。
- 涂布于含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板。
- 37°C 过夜培养, 通过蓝/白菌落筛选挑选出白色菌落\*<sup>2</sup>。  
\* 2: 使用转化效率为  $1 \times 10^8$  菌落/μg pUC119DNA 的 *E. coli* JM109 Competent Cells 时, 50 ng 载体可获得  $1 \sim 5 \times 10^4$  个白色菌落。

## ● 相关产品

Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR<sup>®</sup> (Code No. 6019)

Mighty Cloning Reagent Set (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)

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>

SpeedSTAR<sup>™</sup> HS DNA Polymerase (Code No. RR070A/B)

Terra<sup>™</sup> PCR Direct Polymerase Mix (Code No. 639270, 639271)

MightyAmp<sup>™</sup> DNA Polymerase Ver.3 (Code No. R076A/B)

TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> (Code No. RR001A/B/C)

TaKaRa Ex Taq<sup>®</sup> Hot Start Version (Code No. RR006A/B)

TaKaRa LA Taq<sup>®</sup> (Code No. RR002A/B)

TaKaRa LA Taq<sup>®</sup> Hot Start Version (Code No. RR042A/B)

TaKaRa Taq<sup>™</sup> (Code No. R001A/B/C)

TaKaRa Taq<sup>™</sup> Hot Start Version (Code No. R007A/B)

<检测插入DNA片段用>

EmeraldAmp<sup>®</sup> PCR Master Mix (Code No. RR300A/B)

EmeraldAmp<sup>®</sup> MAX PCR Master Mix (Code No. RR320A)

SapphireAmp<sup>®</sup> Fast PCR Master Mix (Code No. RR350A/B)

*TaKaRa Ex Taq*, *TaKaRa LA Taq*, EmeraldAmp, SapphireAmp, and PrimeSTAR are registered trademarks of Takara Bio Inc.

MightyAmp, *TaKaRa Taq*, and SpeedSTAR are trademarks of Takara Bio Inc.

Terra is a trademark of Takara Bio USA, 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](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。

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.takarabiomed.com.cn>