

Code No. RR015

研究用

TaKaRa

TaKaRa LA PCR™
in vitro Cloning Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● Kit 外所需试剂	1
● 保 存	1
● 原 理	1
● 实验操作	2
● 注意事项	7
● Specific Primer (S1,S2)的设计标准	8
● Cassette 以及 Cassette Primer 序列	8
● 参考文献	9
● 关联产品	9

● 制品说明

本试剂盒利用 PCR 法, 使用 *TaKaRa LA Taq*、Cassette 以及 Cassette Primer, 可特异性地扩增 cDNA 或基因组上的未知区域。通过应用 LA PCR 技术, 提高了保真性能, 减少了克隆时变异点的导入。使用本试剂盒, 不必经过繁杂的文库构建及筛选等, 就能简单地得到基因组等上的长链目的 DNA。

● 制品内容 (10 次量, 50 μ l PCR)

1. <i>Sau</i> 3A I Cassette (200 ng/ μ l)	25 μ l
<i>Sau</i> 3A I 是 4 个碱基酶切位点的限制酶。用 <i>Sau</i> 3A I 处理 DNA 片段是得到更多片段。所以, <i>Sau</i> 3A I Cassette 浓度高于其他 Cassette。 <i>Sau</i> 3A I 在 control 反应中稀释 10 倍后使用。一般样品反应中无需稀释。	
2. <i>Eco</i> R I Cassette (20 ng/ μ l)	25 μ l
3. <i>Hind</i> III Cassette (20 ng/ μ l)	25 μ l
4. <i>Pst</i> I Cassette (20 ng/ μ l)	25 μ l
5. <i>Sa</i> I Cassette (20 ng/ μ l)	25 μ l
6. <i>Xba</i> I cassette (20 ng/ μ l)	25 μ l
7. Cassette Primer C1 (10 pmol/ μ l)	20 μ l
8. Cassette Primer C2 (10 pmol/ μ l)	20 μ l
9. Ligation Solution I*	150 μ l
10. Ligation Solution II*	75 μ l
11. <i>TaKaRa LA Taq</i> (5 U/ μ l)	10 μ l
12. 10X LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ Plus)	100 μ l
13. dNTP Mixture (各 2.5 mM)	160 μ l
14. Control DNA Fragment [human genomic DNA (HL60) <i>Bam</i> H I-digested fragment] (100 ng/ μ l)	25 μ l
15. Control Specific Primer CS-1 (10 pmol/ μ l)	10 μ l
16. Control Specific Primer CS-2 (10 pmol/ μ l)	10 μ l

* : Ligation Solution I 和 II 与 DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Code No. 6022) 中的组份相同。

Control Primers 序列:

Control Specific Primer CS-1

5' -ATAGTGAATGAAGTTTCATTTTTCATTCTCACAA-3'

Control Specific Primer CS-2

5' -TGATAGGCACTGACTCTCTGTCCCTTGGGCTGTTT-3'

● Kit 外所需试剂

与已知序列互补的 Primers S1 和 S2 不包含在 Kit 内。客户应自行准备特异性引物 S1 和 S2。

● 保存: -20°C。

● 原理

本试剂盒原理的具体步骤如下:

- 1) 用适当的限制酶将待克隆的 Target DNA 完全分解。
- 2) 与具有对应的限制酶酶切位点的 Cassette 进行连接反应。
- 3) 用 Cassette Primer (Primer C1) 和根据已知区域的 DNA 序列设计的 Primer (Primer S1), 进行第 1 次 PCR (1st PCR) 反应。

- 4) 使用内侧 Primer (Primer C2 和 Primer S2) 进行第 2 次 PCR (2nd PCR) 反应, 特异性地扩增目的 DNA 片段。

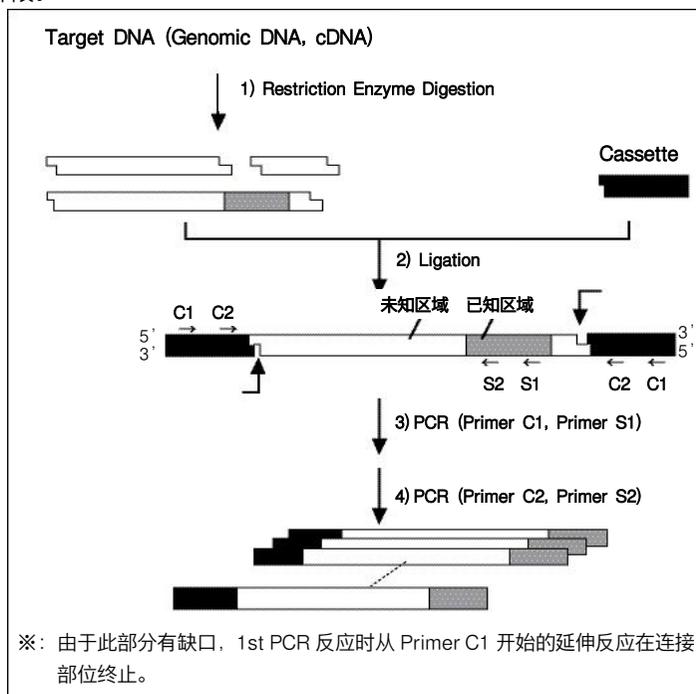


图 1. 本试剂盒的 PCR 扩增原理图

具体原理见图 1。因为在设计上, Cassette 的 5' 末端没有磷酸基, 所以 Target DNA 的 3' 末端和 Cassette 的 5' 末端的连接部位形成缺口。在第一次 PCR 反应的第一个循环时, 从 Primer C1 开始的延伸反应在连接部位终止, 限制了 Primer C1 和 Primer C1 同一引物之间的扩增, 从而控制了非特异性 PCR 扩增。只有从 Primer S1 开始延伸合成的 DNA 链, 才能成为 Primer C1 的模板, 进行 DNA 的特异性扩增反应。再用内侧 Primer (Primer C2, Primer S2) 进一步进行第二次 PCR 反应, 可以高效特异性地扩增目的 DNA。当蛋白质的氨基酸序列已知时, 可以根据已知信息设计 Mixed primer 代替 Primer S1, S2, 扩增编码蛋白质的 cDNA。

● 实验操作

1. 一般样品 PCR 反应

A. DNA 的限制酶酶切反应

- ① 按下列组份配制限制酶酶切反应液。室温下保温 3-5 小时。

试剂	使用量
DNA	5 μ g
限制酶	50 U*
10X 限制酶 Buffer	5 μ l
灭菌水	up to 50 μ l

* 使 DNA 完全分解的必要酶量, 根据制备的 DNA 纯度而定, 一般 10 U 分解 1 μ g DNA。

- ② 反应结束后, 进行乙醇沉淀回收 DNA。溶解于 10 μ l 的灭菌水中。

B. 连接反应

① 按下列组份配制连接反应液，16°C，反应 30 分钟。

试剂	使用量
A 的 DNA 溶液	5 μ l
Cassette*	2.5 μ l
Ligation Solution I	15 μ l
Ligation Solution II	7.5 μ l

* 使用 *Sau3A* I Cassette 与使用 6 个碱基酶切位点的限制酶(*Bam*H I、*Bgl* II、*Fba* I、*Mfl* I)分解的 DNA 连接时，需将 *Sau3A* I Cassette 稀释 10 倍使用。

② 反应结束后，进行乙醇沉淀回收 DNA。溶解于 5 μ l 的灭菌水中。

C. PCR 扩增

① 将 B-② 的 DNA 溶液 1 μ l 加入到 33.5 μ l 灭菌水中，94°C 加热 10 分钟。

② 按照下列组份配制 1st PCR 反应液。

试剂	使用量
C-① 的 DNA 溶液	34.5 μ l
10X LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.5 μ l
dNTP Mixture	8 μ l
Primer C1	1 μ l
Primer S1	1 μ l

按以下条件进行 1st PCR 反应。

扩增片段 < 4 kb 时

94°C	30 sec	} 30 cycles
55°C	30 sec	
72°C	4 min*	

* 扩增 1 kb 以下片段时，设置 1 min。

扩增片段 \geq 4 kb 时

96-98°C	10-20 sec	} 30 cycles
68°C	15 min	

③ 用灭菌水将 C-② 的 PCR 反应液按适当倍数 (1~10,000 倍) 稀释，再取 1 μ l 进行 2nd PCR 反应，2nd PCR 反应液组份如下。

试剂	使用量
C-② 的 1st PCR 反应液	1 μ l
10X LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.5 μ l
dNTP Mixture	8 μ l
Primer C2	1 μ l
Primer S2	1 μ l
灭菌水	33.5 μ l

按以下条件进行 2nd PCR 反应。

扩增片段 < 4 kb 时

94°C	30 sec	} 30 cycles
55°C	30 sec	
72°C	4 min*	

* 扩增 1 kb 以下片段时，设置 1 min。

扩增片段 ≥ 4 kb 时

96-98°C	10-20 sec	} 30 cycles
68°C	15 min	

④ 反应结束后，进行琼脂糖凝胶电泳确认 PCR 反应产物。

注意：本产品的各 Cassette 中含有 T7 启动子序列，扩增所得到的 1st PCR 和 2nd PCR 产物则均含有 T7 启动子序列。

2. Control PCR 反应

A. 连接反应

① 按下列组份配制连接反应液。

试剂	使用量
Control DNA fragment	5 μl
<i>Sau3A</i> I Cassette (10 倍稀释) *	2.5 μl
Ligation Solution I	15 μl
Ligation Solution II	7.5 μl

*：由于 Control DNA 片段是被 *Bam*H I 消化的人类基因组 DNA (HL60)，用灭菌水稀释 10 倍后使用 *Sau3A* I cassette。

② 反应结束后，进行乙醇沉淀回收 DNA。溶解于 5 μl 的灭菌水中。

B. PCR 扩增

① 将 A-② DNA 溶液 1 μl 加入到 33.5 μl 灭菌水中，94°C 加热 10 分钟。

② 按下列组份配制第一次 (1st) PCR 反应液。

试剂	使用量
B-①的 DNA 溶液	34.5 μl
10X LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μl
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.5 μl
dNTP Mixture	8 μl
Primer C1	1 μl
Primer CS-1	1 μl

按以下条件进行 1st PCR 反应。

94°C	30 sec	} 30 cycles
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	

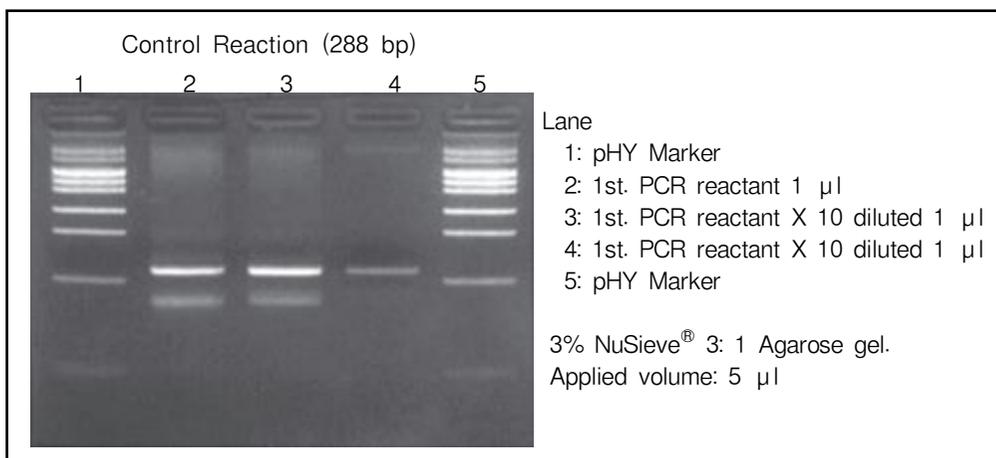
- ③ 用灭菌水将 B-② 的 PCR 反应液按适当倍数 (1~10,000 倍) 稀释, 再取 1 μ l 进行 2nd PCR 反应, 2nd PCR 反应液组份如下。

试剂	使用量
B-② 的 1st PCR 反应液 (或稀释液)	1 μ l
10X LA PCR Buffer II (Mg^{2+} plus)	5 μ l
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.5 μ l
dNTP Mixture	8 μ l
Primer C2	1 μ l
Primer CS-2	1 μ l
灭菌水	up to 33.5 μ l

按以下条件进行 2nd PCR 反应。

94°C 30 sec
 55°C 30 sec } 30 cycles
 72°C 30 sec

- ④ 反应结束后, 取 PCR 反应液 (5~10 μ l) 进行琼脂糖凝胶电泳, 可以确认到 288 bp 的 PCR 扩增片段。



3. 应用例: 以 Human genomic DNA 为模板, 使用本试剂盒对 β -globin region 的 9.3 kb 的 DNA 片段进行 PCR 扩增。

A. DNA 的限制酶酶切反应

- ① 按下列组份配制限制酶酶切反应液。30°C 保温 3 小时。

试剂	使用量
Human genomic DNA	3 μ g
<i>Bam</i> H I	30 U
10X Buffer K	5 μ l
灭菌水	up to 50 μ l

- ② 反应结束后, 进行乙醇沉淀回收 DNA。溶解于 10 μ l 的灭菌水中。

B. 连接反应

- ① 按下列组份配制连接反应液。16°C保温 30 分钟。

试剂	使用量
A-②的 DNA 溶液	5 μ l
<i>Sau</i> 3A I Cassette (10 倍稀释)	2.5 μ l
Ligation Solution I	15 μ l
Ligation Solution II	7.5 μ l

- ② 反应结束后，进行乙醇沉淀回收 DNA。溶解于 5 μ l 的灭菌水中。

C. 1st PCR 扩增

- ① 将 B-②的 DNA 溶液 1 μ l 加入到 33.5 μ l 灭菌水中，94°C加热 10 分钟。

- ② 按下列组份配制 1st PCR 反应液。

试剂	使用量
C-①的 DNA 溶液	34.5 μ l
10X LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.5 μ l
dNTP Mixture	8 μ l
Primer C1	1 μ l
Primer A1	1 μ l
Total	50 μ l

Primer A1 5' -CAGAAAGTGTTTCTGAAAGAGGGATTAGCCCGTTG-3'

- ③ 按以下条件进行 1st PCR 反应。

94°C 1 min



98°C 10 sec
68°C 15 min } 14 cycles



98°C 10 sec
68°C 15 min + 15 sec/cycle* } 16 cycles

(* : increment = 15 sec per cycle

Use the autosegment extension feature for PCR Thermal Cycler)



72°C 10 min

D. 2nd PCR 扩增

- ① 用灭菌水将 1st PCR 反应液按 1 倍、10 倍、100 倍稀释。

- ② 2nd PCR 反应液组份如下。

试剂	使用量
D-①的 1st PCR 反应液 (或稀释液)	1 μ l
10X LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus)	5 μ l
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.5 μ l
dNTP Mixture	8 μ l
Primer C2	1 μ l
Primer A2	1 μ l
灭菌水	up to 50 μ l

Primer A2 5' -TGCACCTGCTCTGTGATTATGACTATCCCACAGTC-3'

- ③ 2nd PCR 反应条件同 1st PCR。
- ④ 反应结束后，各取 PCR 反应液 5 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 扩增产物，电泳结果见图 3。结果显示，可以清晰地确认到 9.3 kb 的 PCR 扩增产物。

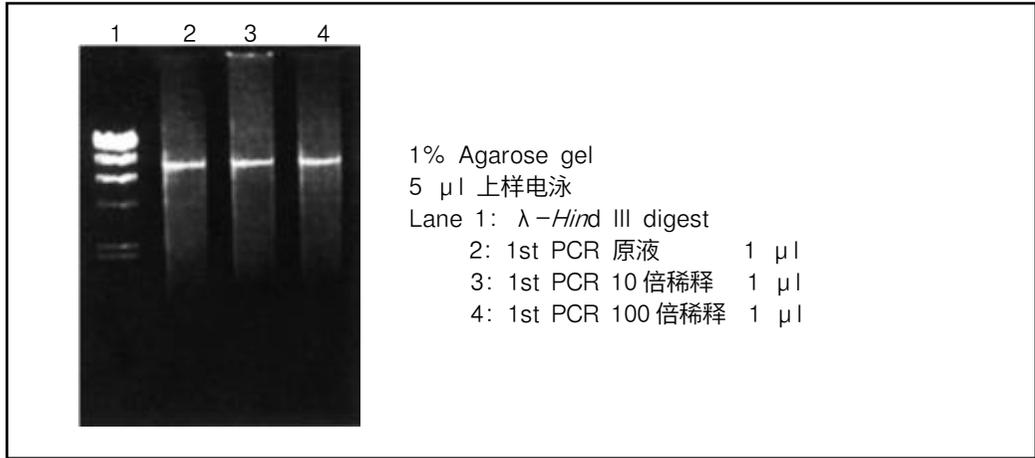
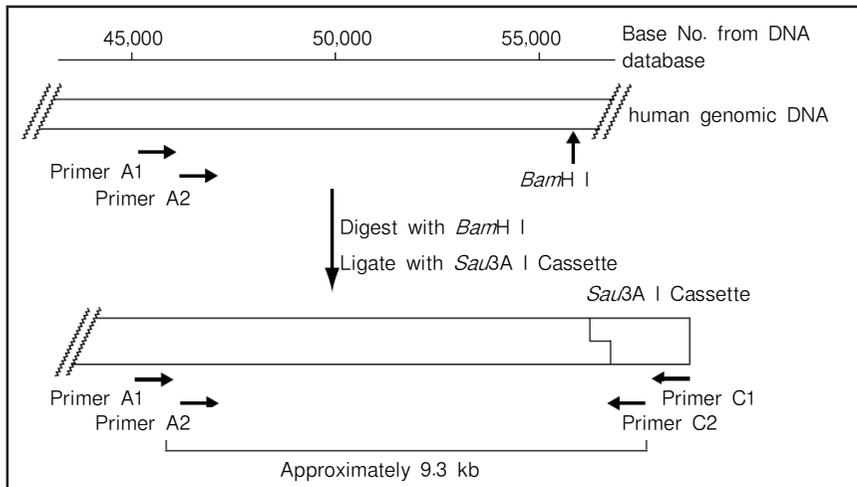


图 3. β -globin region 9.3 kb DNA 片段的 PCR 扩增结果

扩增原理见下图。



● 注意事项

当进行 PCR 时，请注意下列事项：

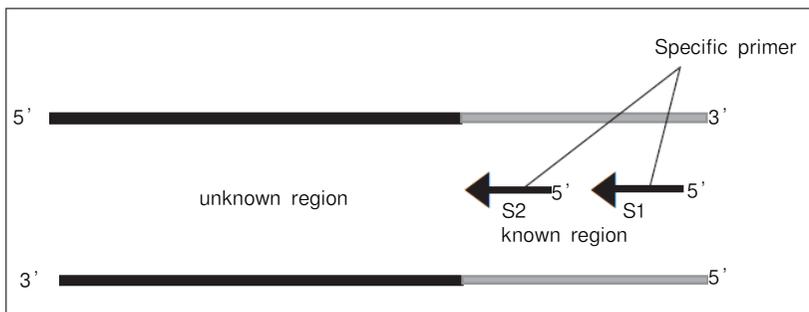
- 1) 37°C 室温溶解完全后，用枪头搅拌或上下摇晃 microtube 使试剂混合均匀。避免剧烈振荡。有时当混合 10X LA PCR Buffer 和 *TaKaRa* LA *Taq* 时，小心混匀，避免产生气泡或使酶失活。使用前试剂放置在冰上。
- 2) 反应前用移液器轻轻吸打混匀反应液。不要剧烈振荡。
- 3) 退火及延伸条件：45–68°C 范围内以 2°C 间隔实验确定最适退火温度。在 3 step PCR 中，延伸速度为 72°C 1 min/kb。退火–延伸在 68°C 进行 (2 step PCR) *，同样建议 1 min/kb。当温度低于 68°C 时，需更长时间。

* : 由于 *TaKaRa* LA *Taq* 在 60–68°C 范围内显示出极强活性，可进行 Shuttle PCR (Two step PCR)。

● Specific Primer (S1, S2)的设计标准

1. 根据已知区域设计 Specific Primer

设计方向为需要扩增的未知区域的方向。S2 的位置应设计在 S1 的内侧，两个引物间的距离没有严格的规定。



设计引物时还需要注意以下几点:

- ◆ 引物长度为 20~35 mers. (扩增长链 DNA($\geq 4\text{kb}$)时建议为 30~35 mers)。
 - ◆ GC 含量在 50%左右, 避免局部 GC 或 AT 集中。特别是引物的 3' 端不要 AT 集中。
 - ◆ 引物自身不要形成明显的二级结构。
 - ◆ 两个 Specific Primer (S1、S2) 要与 Cassette Primer (C1、C2) 组合使用, 所以设计时还要考虑不要与配对的引物形成引物二聚体, 特别是 3' 端的 3、4 个碱基不要与配对的引物序列互补。
- 2) 根据蛋白质的氨基酸序列进行设计引物时应注意以下几点:
- ◆ 首先将氨基酸序列转换成编码氨基酸的碱基序列。应尽量选择简并少的区域设计引物, 但与简并少而较短的引物相比, 还不如使用简并多而较长的引物比较合适。
 - ◆ 如果想减少引物简并, 可考虑 Codon usage 进行设计。
 - ◆ 3' 末端不要简并。
 - ◆ 如果使用 Mixed primer 进行 PCR 扩增时, 需要将退火温度降低, 而其结果往往会引起非特异性的扩增。如果有关 DNA 序列信息较多时, 可进一步在内侧再设计一个引物, 用以鉴定目的 DNA 片段。

● Cassette 以及 Cassette Primer 序列

<i>Sau</i> BA I	5' HOGTACA TATTG TCGTT AGAAC GCGTA ATACG ACTCA CTATA GGGAG 3'
Cassette	3' CATGT ATAAC AGCAA TCTTG CGCAT TATGC TGAGT GATAT CCCTC TAG OH 5'
<i>Eco</i> R I	5' HOGTACA TATTG TCGTT AGAAC GCGTA ATACG ACTCA CTATA GGGAG AG 3'
Cassette	3' CATGT ATAAC AGCAA TCTTG CGCAT TATGC TGAGT GATAT CCCTC TCTTA A OH 5'
<i>Hind</i> III	5' HOGTACA TATTG TCGTT AGAAC GCGTA ATACG ACTCA CTATA GGGAG A 3'
Cassette	3' CATGT ATAAC AGCAA TCTTG CGCAT TATGC TGAGT GATAT CCCTC TTCGA OH 5'
<i>Pst</i> I	5' HOGTACA TATTG TCGTT AGAAC GCGTA ATACG ACTCA CTATA GGGAG ACTGC A 3'
Cassette	3' CATGT ATAAC AGCAA TCTTG CGCAT TATGC TGAGT GATAT CCCTC TG OH 5'
<i>Sal</i> I	5' HOGTACA TATTG TCGTT AGAAC GCGTA ATACG ACTCA CTATA GGGAG AG
Cassette	3' CATGT ATAAC AGCAA TCTTG CGCAT TATGC TGAGT GATAT CCCTC TCAGC T OH 5'
<i>Xba</i> I	5' HOGTACA TATTG TCGTT AGAAC GCGTA ATACG ACTCA CTATA GGGAG AT 3'
Cassette	3' CATGT ATAAC AGCAA TCTTG CGCAT TATGC TGAGT GATAT CCCTC TAGAT C OH 5'
Cassette Primer C1	5' GTACA TATTG TCGTT AGAAC GCGTA ATACG ACTCA 3'
Cassette Primer C2	5' CGTTA GAACG CGTAA TACGA CTCAC TATAG GGAGA 3'

● 参考文献

- 1) Isegawa Y, Sheng J, Sokawa Y, Yamanishi K, Nakagomi O, and Shigeharu U. *Molecular and Cellular Probes*. (1992) **6**: 467–475.
- 2) Barnes W M. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1994) **91**: 2216–2220.
- 3) Cheng S et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1994) **91**: 5695–5699.
- 4) Cheng S et al. *Nature*. (1994) **369**: 684–685.

● 关联产品

*Bam*H I (Code No. 1010A/B)

*Eco*R I (Code No. 1040A/B)

Hind III (Code No. 1060A/B)

Pst I (Code No. 1073A/B)

Sal I (Code No. 1080A/B)

Xba I (Code No. 1093A/B)

Bgl II (Code No. 1021A/B)

Fba I (Code No. 1045A/B)

Mfl I (Code No. 1070A/B)

DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Code No. 6022)

TaKaRa LA Taq (Code No. RR002A/B)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Gradient (Code No. TP600)

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ *Touch* (Code No. TP350)

TaKaRa LA Taq is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Thermal Cycler Dice 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.takarabio.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: <https://www.takarabiomed.com.cn>