

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:131126-20  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

一站式平末端克隆试剂盒

One-Stop Blunt-ended Cloning Kit

使用手册 V1.1

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

| <p><b>产品及特点</b></p> | <p>本产品是一种能使 DNA 片段的末端平滑化、5' 端的磷酸化、DNA 片段和载体的连接等诸反应高效快速完成的试剂盒。它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 适用范围包括：由高保真 DNA 聚合酶如 Pfu、Pwo、DeepVent 等扩增而来的 PCR 产物；一些限制性内切酶如 EcoRV、SmaI 等酶切产生的 DNA 片段；粘端 DNA 用 DNA 聚合酶补平后的片段。</li> <li>2. DNA 片段的末端平滑化反应和 5' 端的磷酸化反应可在一个反应体系中同时进行，反应时间只需 10 min。</li> <li>3. 本试剂盒中还含有高效的 DNA 连接液，可在短时间内完成连接反应。</li> </ol>  |             |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
|---------------------|---|-------------|--|-----|-----|---------|-----------------|-----------------|------------|---------------|---------|------------|--------|---------|-------------|-----|--------|-------------|------|----------|-----|
| <p><b>规格及成分</b></p> | <table border="1" data-bbox="472 663 1441 1032"> <thead> <tr> <th>成 份</th> <th>编 号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10×末端平滑化/磷酸化缓冲液</td> <td>131126a</td> <td>40 μL (红盖)</td> </tr> <tr> <td>末端平滑化/磷酸化 Mix</td> <td>131126b</td> <td>20 μL (白盖)</td> </tr> <tr> <td>连接反应溶液</td> <td>131126c</td> <td>120 μL (绿盖)</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>400 μL (黄盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>131126sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>   |             |  | 成 份 | 编 号 | 十孔盒包装   | 10×末端平滑化/磷酸化缓冲液 | 131126a         | 40 μL (红盖) | 末端平滑化/磷酸化 Mix | 131126b | 20 μL (白盖) | 连接反应溶液 | 131126c | 120 μL (绿盖) | 超纯水 | 100935 | 400 μL (黄盖) | 使用手册 | 131126sc | 1 份 |
| 成 份                 | 编 号   | 十孔盒包装       |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
| 10×末端平滑化/磷酸化缓冲液     | 131126a   | 40 μL (红盖)  |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
| 末端平滑化/磷酸化 Mix       | 131126b   | 20 μL (白盖)  |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
| 连接反应溶液              | 131126c   | 120 μL (绿盖) |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
| 超纯水                 | 100935  | 400 μL (黄盖) |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
| 使用手册                | 131126sc  | 1 份         |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
| <p><b>运输及保存</b></p> | <p>低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。</p>   |             |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
| <p><b>自备试剂</b></p>  | <p>DNA 片段等。</p>   |             |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
| <p><b>使用方法</b></p>  | <p>一、用 PCR 反应液直接进行克隆时：</p> <p><b>Blunting Kination 反应</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 在微量离心管中配制下列反应液。</li> </ol> <table border="1" data-bbox="619 1397 1294 1715"> <thead> <tr> <th>试剂</th> <th>使用量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PCR 反应液</td> <td>2 μL</td> </tr> <tr> <td>10×末端平滑化/磷酸化缓冲液</td> <td>2 μL</td> </tr> <tr> <td>末端平滑化/磷酸化 Mix</td> <td>1 μL</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>15 μL</td> </tr> </tbody> </table> <ol style="list-style-type: none"> <li>2. 37℃反应 10 min。</li> <li>3. 70℃热处理 5 min。</li> </ol> <p><b>Ligation 反应</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4. 取 3. 的溶液 5 μL 到另一个新的微量离心管中。</li> <li>5. 加入 1 μL 经过去磷酸化处理的平滑末端载体 DNA (50-100 ng/μL) ，混合均匀。</li> <li>6. 加入 6 μL 的连接反应溶液（连接反应溶液请于冰中融解，使用前混匀）。</li> </ol> |             |  | 试剂  | 使用量 | PCR 反应液 | 2 μL            | 10×末端平滑化/磷酸化缓冲液 | 2 μL       | 末端平滑化/磷酸化 Mix | 1 μL    | 超纯水        | 15 μL  |         |             |     |        |             |      |          |     |
| 试剂                  | 使用量   |             |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
| PCR 反应液             | 2 μL  |             |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
| 10×末端平滑化/磷酸化缓冲液     | 2 μL  |             |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
| 末端平滑化/磷酸化 Mix       | 1 μL  |             |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |
| 超纯水                 | 15 μL   |             |  |     |     |         |                 |                 |            |               |         |            |        |         |             |     |        |             |      |          |     |

应避免多次反复冻融。), 混合。

7. 16°C反应 1 h。

8. 全量转化 100 μL 的感受态细胞。

注意：用电刺激法做细菌转化时，先用乙醇沉淀或苯酚抽提等方法置换 DNA 溶解缓冲液后再进行电转化；PCR 产物中混有非特异性 DNA 时，可以通过琼脂糖凝胶电泳回收目的 DNA 片段；PCR 反应液最适用量 2 μL，用量过多会降低反应效率。如需提高 DNA 用量请用乙醇沉淀法精制 DNA 片段后再进行反应。

## 二、用精制后的 DNA 片段进行克隆时：

### Blunting Kination 反应

9. 在微量离心管中配制以下反应液。

| 试剂              | 使用量         |
|-----------------|-------------|
| DNA 片段          | 0.2-20 pmol |
| 10×末端平滑化/磷酸化缓冲液 | 2 μL        |
| 末端平滑化/磷酸化 Mix   | 1 μL        |
| 超纯水             | up to 20 μL |

10. 37°C反应 10 min。

11. 70°C热处理 5 min。

### Ligation 反应

12. 取 11. 的溶液 5 μL 到另一个新的微量离心管中。

13. 加入 1 μL 经过去磷酸化处理的平滑末端载体 DNA (50-100 ng/μL) 混合均匀。

14. 加入 6 μL 的连接反应溶液，混合。

15. 16°C反应 1 h。

16. 全量反应液用于转化 100 μL 的感受态细胞。

注意：用电刺激法做细菌转化时，先用苯酚抽提和乙醇沉淀等方法置换 DNA 溶解缓冲液后再进行电转化；插入 DNA 与载体 DNA 的摩尔数比应为 2 : 1-10 : 1。

|             |  |
|-------------|--|
| <b>疑问解答</b> | <p>1. 连接转化效率低时, 请试用下述方法进行改进。</p> <ul style="list-style-type: none"><li>① 确认感受态细胞的转化效率。</li><li>② 延长连接反应时间至过夜反应。</li><li>③ 连接反应后向溶液中加入 NaCl 使其终浓度为 500 mM, 再做转化。</li></ul> <p>如果以上操作仍不能改善连接效率, 则需对连接后的 DNA 进行纯化。</p> <p>2. 当使用具有 lacZ 基因的载体克隆短链 DNA 片段时, 有时即使插入了 DNA 片段也会有不出现终止密码。或者阅读框不改变的情况发生, 在选择培养基上形成淡蓝色的单菌落。</p> <p>3. 短链 DNA 克隆时, 有时会出现插入内含数个串联 DNA 片段的克隆体。</p> <p>4. 如果 PCR 反应过程中需要加入矿物油, 则要勿将其带入后面的反应液中。带有磷酸基的 3' 凹陷末端的 DNA 片段无法使用本试剂盒进行末端平滑化反应。</p> |
| <b>关联产品</b> | SuperTOPO-Amp TA 克隆试剂盒 (CAT#:160686-25A)   |