

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; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</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"> 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。 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。 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。 																				
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="475 656 1437 1039"> <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>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存，保存期限为一年。</p>																				
<p>自备试剂</p>	<p>DNA 片段等。</p>																				
<p>使用方法</p>	<p>一、用 PCR 反应液直接进行克隆时：</p> <p>Blunting Kination 反应</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 在微量离心管中配制下列反应液。 <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"> 2. 37℃反应 10 min。 3. 70℃热处理 5 min。 <p>Ligation 反应</p> <ol style="list-style-type: none"> 4. 取 3. 的溶液 5 μL 到另一个新的微量离心管中。 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。 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）。 			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 \times 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。

疑问解答	<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">① 确认感受态细胞的转化效率。② 延长连接反应时间至过夜反应。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。 <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>
关联产品	SuperTOPO-Amp TA 克隆试剂盒 (CAT#:160686-25A)