


「基因重组·克隆」



第4章 目录	4-1
<hr/>	
→ 按用途分类的产品流程图	4-2
关于基因克隆	4-3
关于突变导入	4-4
<hr/>	
→ 试剂盒类	
TArget Clone /TArget Clone -Plus-	4-6
KOD -Plus- Mutagenesis Kit	4-8
Ligation high	4-10
Ligation high Ver.2	4-11
ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit	4-13
<hr/>	
→ 多聚酶类 (PCR 酶以外)	
多聚酶比较表	4-14
Thermo T7 RNA Polymerase 《TT7》	4-15

INDEX

{ 按用途分类的产品流程图 }

想进行高效率的基因克隆

产生平滑末端的 DNA 聚合酶 (高保真性)

高保真性 PCR 酶 → (2-14 页)

- KOD One® PCR Master Mix 系列
- KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2
- KOD -Plus- Neo

高成功率 PCR 酶 → (2-22 页)

- KOD FX Neo
- KOD FX
- KOD -Multi & Epi-®

PCR 产物的纯化

DNA 片段纯化试剂盒

→ (5-10 页)

- MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-

突变导入实验

特异部位的突变导入试剂盒

→ (4-8 页)

- KOD -Plus- Mutagenesis Kit



TA 克隆

高效率 TA 克隆试剂盒 (KOD 专用)

→ (4-6 页)

- TArget Clone -Plus-

※ 使用 KOD Dash 以外的 KOD 系列酶扩增 DNA 片段，请注意 PCR 产物的末端已被平滑化，不可以直接进行 TA 克隆。

TA 克隆

高效率 TA 克隆试剂盒 → (4-6 页)

- TArget Clone

扩增产物末端加 A 的 DNA 聚合酶

通用 PCR 酶 → (2-31 页) 高效率 PCR 酶 → (2-29 页)

- rTaq DNA Polymerase
- Quick Taq® HS DyeMix
- rTth DNA Polymerase
- Blend Taq® / Blend Taq® -Plus-
- KOD Dash

1. 扩增产物末端形状与 TA 克隆

(1) TdT活性与3'→5'Exonuclease (校正) 活性

如第2章所介绍的, 在扩增片段的3'末端添加一个碱基(主要是腺嘌呤)的TdT(Terminal deoxynucleotidyl transferase)活性是所有PCR酶所具备的活性。但是, 校正活性很强的酶, 其扩增产物的末端往往已被平滑化。加A的扩增片段可直接用TA克隆法进行克隆, 但被平滑化的扩增片段不能与T载体连接, 请务必注意。下表为用本公司代表性PCR酶扩增产物的末端。

表1 各PCR酶扩增产物末端形状的差异

扩增产物末端加 A 的酶	扩增产物末端被平滑化的酶
rTaq DNA Polymerase (→ 2-33 页)	KOD One® Master Mix 系列 (→ 2-14 页)
rTth DNA Polymerase (→ 2-34 页)	KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2 (→ 2-20 页)
KOD Dash (→ 2-30 页)	KOD -Plus- Neo (→ 2-18 页)
Blend Taq / Blend Taq -Plus- (→ 2-29 页)	KOD FX (→ 2-24 页)、KOD FX Neo (→ 2-22 页)、KOD -Multi & Epi- (→ 2-26 页)

※KOD Dash和Blend Taq虽然混有α型PCR酶(→ 2-5页), 但混合量较少, 因此末端基本上都会加一个碱基。

(2) TA克隆

如上所述, 加A的DNA片段可直接用使用T载体(3'末端有一个T碱基突出的载体)的方法【TArget Clone (→ 4-6页)等】进行克隆。

另一方面, 平滑末端的扩增产物进行TA克隆时, 需要特别的方法。TArget Clone -Plus- (→ 4-6页)就是为上表右边KOD系列PCR酶的扩增产物直接进行TA克隆而开发的试剂盒。如图1所示, TArget Clone -Plus-中使用了KOD DNA Polymerase(以下称KOD)的中和抗体和Taq DNA Polymerase(以下称Taq)。KOD的耐热性比Taq等要高, PCR反应液中的酶在反应后仍能保持活性。因此, 即便在该溶液中加入Taq用来添加碱基, KOD残留的校正活性仍会将DNA末端再次平滑化。为防止该现象, 在该试剂盒中加入了KOD的中和抗体。Taq通过TdT活性在PCR产物的3'末端添加一个碱基, KOD的中和抗体抑制校正活性防止末端被再次平滑化, 从而使得添加了一个碱基的PCR产物可直接与试剂盒添附的T载体连接。

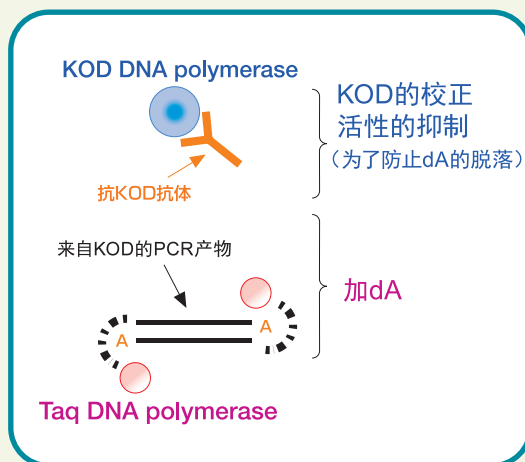


图1 TArget Clone -Plus- 的原理
抗 KOD 抗体抑制 KOD 酶的校正活性。
同时 Taq 在 PCR 产物的平滑末端添加 dA。

2. 平滑末端克隆

(1) 平滑末端克隆的注意点

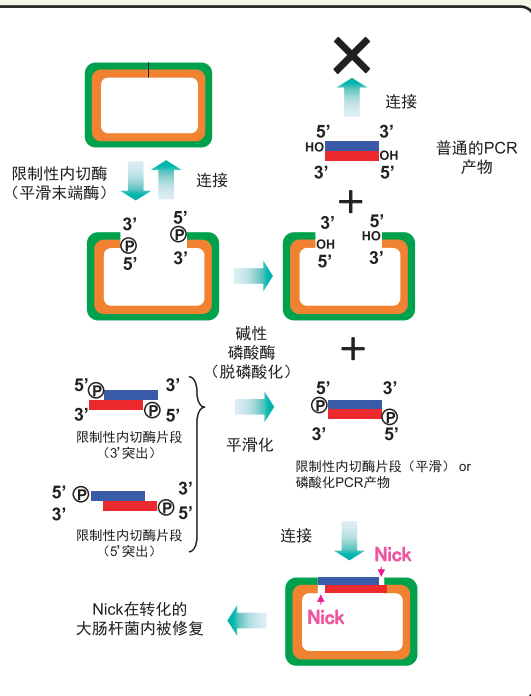
平滑末端DNA片段插入至载体时, 虽然可利用甲基克隆位点上的Sma I、EcoR V等平滑末端位点, 但由于载体之间产生的再结合, 会导致克隆效率显著下降。因此, 在使用限制酶处理的同时, 还要用Alkaline Phosphatase对载体进行脱磷酸化处理。由于DNA的5'末端磷酸化是DNA连接的必要条件, 因此经脱磷酸化的载体末端之间不会发生自连接。

这里必须注意的是, 对用KOD系列酶扩增得到的已经脱磷酸化的平滑位点的连接。通常PCR中所用的引物的5'末端未被磷酸化, 因此, 从原理上讲对脱磷酸化位点的连接不可能实现。此时, 应将引物预先磷酸化后进行PCR或将PCR产物磷酸化。经常会出现忘记引物未被磷酸化的情况, 请务必注意。

另一方面, 用限制酶进行酶切后的平滑末端的两端, 5'末端一般会被磷酸化, 可直接使用。而如果用限制酶进行酶切后得到的是突出末端, 即使用聚合酶进行平滑化(Blunting), 仍能保持5'末端的磷酸基, 可直接与脱磷酸化位点结合。

下页主要讲述用平滑末端位点的一般克隆的流程以及经常使用的磷酸化·脱磷酸化的实验步骤。

平滑末端克隆的流程



Protocol # 1: 引物的磷酸化

【使用试剂】

- 50pmole/μl (μM) 以上的Primer溶液
- T4 Polynucleotide Kinase
- rATP → 稀释为10mM后使用

Primer (50pmole/μl [50μM])	14μl
10×Protruding End Kinase Buffer	2μl
10mM rATP	2μl
T4 Polynucleotide Kinase (5~20U/μl) *1	2μl
Total	20μl

- ↓
- 37°C、1h 反应
- ↓
- 95°C、5min (使 T4 Polynucleotide Kinase 失活)
- ↓ ←添加 50μl 灭菌 Milli-Q 水
- 10pmole/μl [10μM] 作为 primer 溶液使用 * 2 * 3
- ↓
- PCR
- * 1 T4 Polynucleotide Kinase 按最大允许量添加 (最终液量的 10%)。
- * 2 直接用在 PCR 反应中。
- * 3 即便反复冻融仍能使用。

Protocol # 2: PCR 产物的磷酸化

【使用试剂】

- 纯化PCR产物 (平滑末端)
- T4 Polynucleotide Kinase
- rATP → 稀释为10mM后使用

纯化 PCR 产物	~1μg
10×Blunt End Kinase Buffer	5μl
10mM rATP *1 (Code No.ATP-111 稀释后使用)	5μl
T4 Polynucleotide Kinase (5~20U/μl) *1	5μl
Total	50μl

- * 1 T4 Polynucleotide Kinase 按最大允许量添加 (最终液量的 10%)。
- ↓
- 37°C、1h 反应
- ↓
- 纯化

Protocol # 3: 载体的脱磷酸化

【使用试剂】 *E. coli* Alkaline Phosphatase

纯化载体溶液 (限制酶处理后经纯化的溶液)	0.5~2.5μg
10×Buffer	10μl
<i>E. coli</i> Alkaline Phosphatase (0.1~1U/μl) *	10μl
Total	100μl

- * 按 5~20pmoles 的 5' 末端 2U 的标准, 但按最大量 (最终液量的 10%) 添加基本上也可顺利地脱磷酸化。
- ↓
- 平滑末端、3' 突出末端 → 60°C、60min.
- 5' 突出末端 → 37°C、60min.
- ↓
- 用 MagExtractor -PCR & Gel Clean up- (Code No.: NPK-601:→5-10页) 等试剂盒纯化

2

关于突变导入

1. 点突变导入

(1) 用iPCR法进行特异性点突变导入的好处

点突变导入法 (Site-Directed Mutagenesis) 不仅仅用于改变蛋白质的功能, 也是向蛋白质插入tag标记、终止子, 或是对启动子等顺式作用元件进行分析所必须的手段。在这里, 以「KOD-Plus- Mutagenesis Kit (→4-8页)」为中心, 介绍一下基于Inverse PCR (iPCR) 法的位点特异性突变导入法的实验流程及要领。

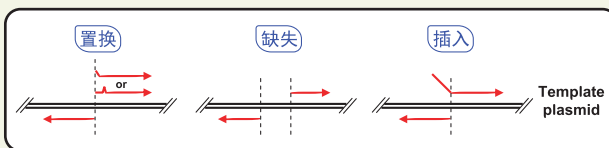


图2 iPCR 法的引物设计方法

可对 KOD 酶系列扩增的平滑末端 PCR 产物直接进行克隆。

高效率 TA 克隆试剂盒

TA Target Clone/ Target Clone -Plus-

TA Target Clone Code: TAK-101 10次份×1 ¥300

TA Target Clone -Plus- Code: TAK-201 10次份×1 ¥380

高效率TA克隆试剂盒。
Taq 系列酶扩增的 PCR 产物(可使用 Target Clone)及 KOD 系列酶扩增的平滑末端 PCR 产物(可使用 Target Clone -Plus-)可直接进行 TA 克隆。



产品内容:

<Target Clone>	
pTA2 Vector (50ng/μl)	10 μl
2 × Ligation Buffer	50 μl
T4 DNA Ligase	10 μl
<Target Clone -Plus->	
pTA2 Vector (50ng/μl)	10 μl
2 × Ligation Buffer	50 μl
T4 DNA Ligase	10 μl
10 × A-attachment Mix	10 μl

保存:

-20°C

参考文献:

1) H.Mizuguchi et al., *J.Biochem* (Tokyo), **126**:762-768 (1999)

商品使用文献:

1) F.Ge et al., *Journal of Biochemistry*, **143** (5) :603-609. (2008)

→ 特征

① 快速·高效率

连接反应最快可在 5 分钟内完成。

② 可靠

载体中有 LacZ, 可进行蓝白斑筛选。

③ 方便

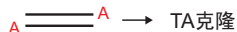
在多克隆位点的两端带有转录用的启动子 (T7、T3), 可用于转录产物的配制。

④ 可用于平滑末端 PCR 产物 [Target Clone -Plus-]

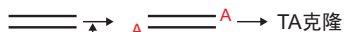
对 KOD、KOD -Plus-、KOD -Plus- Ver.2、KOD -Plus- Neo、及 KOD FX、KOD FX Neo、KOD -Multi & Epi-®、KOD One® PCR Master Mix 的 PCR 产物可直接进行克隆。将 PCR 产物与 A-attachment Mix 混合, 只需 10 分钟即可完成加 dA 反应。

→ 用途

① 普通的 TA 克隆 [Target Clone]



② 对来自 KOD 酶系列的平滑末端产物进行 TA 克隆 [Target Clone -Plus-]

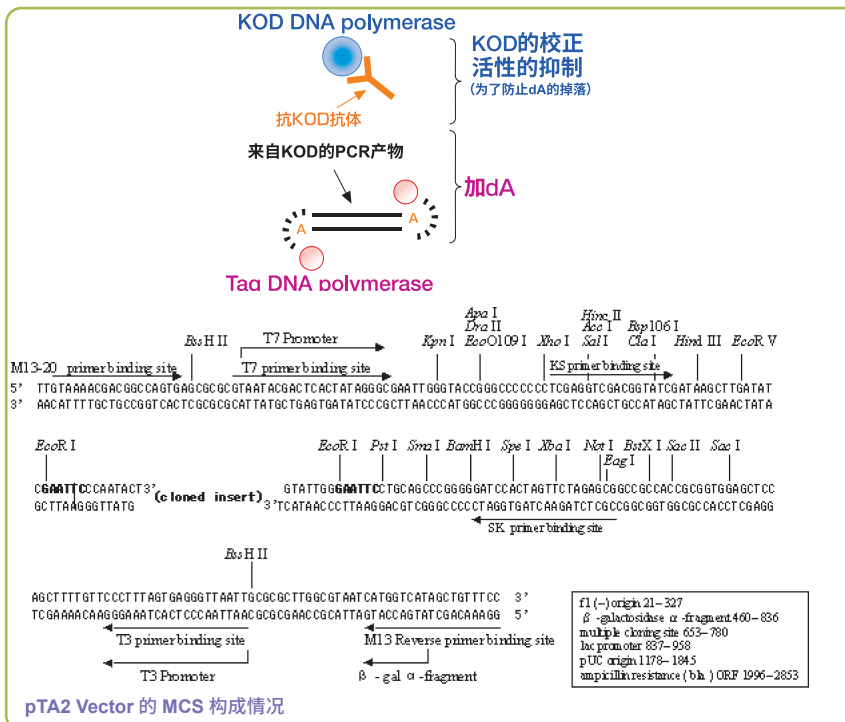


A-attachment mix (60°C · 10min)
 • 抗KOD pol.抗体 (KOD活性的抑制)
 • Taq pol. (对有TdT活性的末端加A)

→ 说明

以 Taq、rTth DNA polymerase、Blend Taq®、KOD Dash 等为基础得到的 PCR 产物的 3' 末端通常带有 dA, 可直接进行 T 载体连接。

另外, 由于 KOD 系列 (KOD DNA Polymerase、KOD -Plus-、KOD -Plus- Ver.2、KOD -Plus- Neo、及 KOD FX、KOD FX Neo、KOD -Multi & Epi-®、KOD One® PCR Master Mix) 的 PCR 产物 3' 末端基本上已被平滑化, 不能直接对其进行 TA 克隆, 因此需使用 Target Clone -Plus- 中的 A-attachment Mix 在平滑末端添加碱基(主要为 dA)。A-attachment Mix 中含有在平滑末端添加碱基用的 Taq DNA polymerase 和用来中和反应后残留的 KOD 3' → 5' Exonuclease 活性(校正活性)的抗 KOD 抗体。(原理请参照下页图示)。



基本反应条件:

<Target Clone>

灭菌蒸馏水	(3-X) μ l
2 \times Ligation Buffer	5 μ l
pTA2 Vector(50ng/ μ l)	1 μ l
PCR 产物	X μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
Total Volume	10 μ l

室温 (15~25°C), 30min.

<Target Clone -Plus>

PCR 产物 from KOD	9 μ l
10 \times A-attachment Mix	1 μ l
Total Volume	10 μ l

60°C, 10min.



灭菌蒸馏水	(3-X) μ l
2 \times Ligation Buffer	5 μ l
pTA2 Vector(50ng/ μ l)	1 μ l
上述已处理 PCR 产物	X μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
Total Volume	10 μ l

室温 (15~25°C), 30min.

→ 几点建议

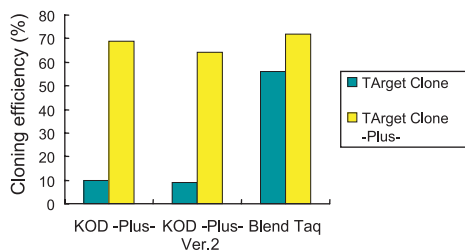
① 采用纯化后 PCR 产物时 A-attachment Mix 的使用方法

如 PCR 反应后产生杂带, 则需对 PCR 产物进行纯化后再使用。此时, 添加 A-attachment Mix、dNTP、MgCl₂ 和 1 \times 浓度的 PCR Buffer 后再进行反应。

→ 结果示例

① 对各种 PCR 产物进行 TA 克隆的效率比较

高保真性酶: 使用 KOD -Plus-、KOD -Plus- Ver.2 及 Blend Taq®, 对来自 human genome 的 β -globin 基因 0.5kb 进行 PCR 扩增。然后, 分别使用 TArget Clone 及 TArget Clone -Plus- 对未经纯化的 PCR 产物进行 pTA2 Vector TA 克隆。结果可见, 在对 KOD -Plus- 及 KOD -Plus- Ver.2 的扩增产物进行克隆的情况下, 如使用 TArget Clone -Plus- 则克隆效率可得到大幅提高。对 Blend Taq® 的扩增产物进行克隆后并比较, 可见即便使用 TArget Clone 也可进行高效率的 TA 克隆。



→ 相关产品

① Target Clone 相关 PCR 酶

Blend Taq® / Blend Taq® -Plus-	-	-	-	→ 2-27 页
KOD Dash	LDP-101	250U \times 1 支	¥350	→ 2-30 页
Quick Taq® HS DyeMix	DTM-101	100 次份	¥375	→ 2-31 页

② Target Clone -Plus-相关PCR酶

KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2	-	-	-	→ 2-20 页
KOD -Plus- Neo	KOD-401	200U \times 1 支	¥1,000	→ 2-18 页
KOD FX	KFX-101	200U \times 1 支	¥1,200	→ 2-24 页
KOD FX Neo	KFX-201	200U \times 1 支	¥2,400	→ 2-22 页
KOD -Multi & Epi-®	KME-101	200 次份	¥2,000	→ 2-26 页
KOD One® PCR Master Mix 系列	-	-	-	→ 2-14 页

可适用于数十 bp 的插入（如 Tag 插入）或数百 bp 的缺失突变。

定点突变导入试剂盒

KOD -Plus- Mutagenesis Kit

Code: SMK-101 20次份 ¥1,800

本品是基于利用 KOD -Plus- 高保真性的 Inverse PCR 法的位点特异性突变导入试剂盒。Inverse PCR 法以质粒为模板，使用反向引物进行 PCR，对质粒全长进行扩增。此时，通过添加了置换、插入序列的引物，可导入各种突变。



产品内容:

KOD -Plus- (1U/μl)	25 μl
10 × Buffer for iPCR	125 μl
2mM dNTPs	125 μl
Dpn I	50 μl
T4 Polynucleotide Kinase	50 μl
Ligation high	250 μl
Control Plasmid	10 μl
Control Primer #1	10 μl
Control Primer #2	10 μl

保存:

-20°C

备注:

本试剂盒中用的 KOD -Plus- 与 2-20 页的产品相同。10 × Buffer for iPCR 进行了最优化组合，为本试剂盒专用。

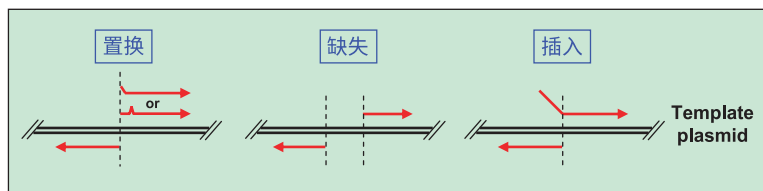
商品使用文献:

- 1) S.Arai et al., *FEBS Letters*, **581** (29):5649-5657.(2007)
- 2) Y.Toritsu et al., *Cancer Science*, **99**(6):1139-1146.(2008)
- 3) N.Shinmen et al., *FEBS Letters*, **583**(12):1916-1922.(2009)

→ 特征

① 导入突变的多样性

与通常的突变导入相比，本试剂盒可进行数十 bp 的插入（如 Tag 的插入）和数百 bp 的缺失突变。另外，也可通过导入不同的碱基突变来创建氨基酸的点突变文库。



② 导入突变的可靠性

最大可得到 95% 的突变导入效率。另外对可能来自 PCR 错误的 2nd-site mutation (目的突变以外的突变) 的可能性降到最低。我们对最大 11kb 的质粒突变导入进行了确认。

③ 操作简便性

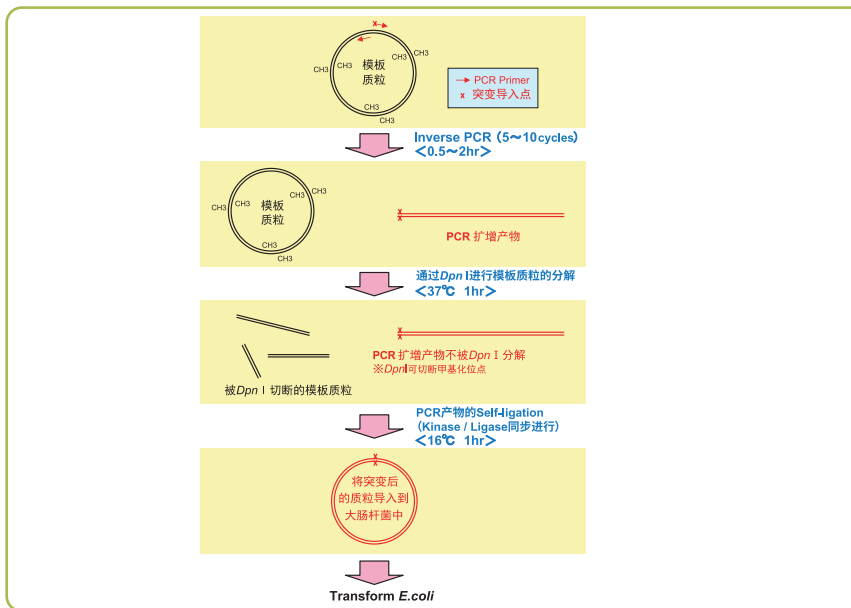
使用本试剂盒不需要使用磷酸化引物。PCR 产物自身环化时，磷酸化反应和连接反应同时进行，包括转化在内只需简单的三个步骤。

→ 用途: 定点突变导入(置换、缺失、插入)

→ 说明

本试剂盒按以下的顺序进行突变导入。

- ① 以质粒 DNA 为模板，使用导入突变的引物进行 Inverse PCR。如想取得缺失突变体，则可在该缺失领域的外侧设计引物。
- ② 在 PCR 产物中添加限制性内切酶 Dpn I，消化模板质粒。(Dpn I 只在识别位点 [GATC] 中的 dA 被甲基化时才对其进行酶切。由于用一般的 Dam⁺ 大肠菌株 [JM109、DH5 α 等] 配制的质粒已被甲基化，因而会被 Dpn I 酶切。)
- ③ 直链状质粒 PCR 产物通过 Self-ligation 环状化，可用于大肠杆菌的转化。



基本反应条件:

灭菌蒸馏水	X μ l
10 × Buffer for iPCR	5 μ l
2mM dNTPs	5 μ l
Forward Primer	15 pmoles
Reverse Primer	15 pmoles
模板质粒 DNA	50 ng
KOD -Plus- (1U/ μ l)	1 μ l
Total Volume	50 μ l

Cycle		
94°C,	2min.	
↓		
98°C,	10sec.	4~10 Cycles
68°C,	Xmin.	

※ 延伸时间 X 根据扩增片段的大小在 1min./kb 左右调整。

※ 循环数也根据扩增片段的大小在 1 循环 /kb 左右调整。初次实验时,可在配制好反应液后分成 2 份分别进行 2 种不同循环数的反应(例: 5 循环、10 循环)。

↓
Kination/Ligation
↓
转化

→ 几点建议

① 关于引物的设计

请参见我公司中文网站中关于 iPCR 法下引物设计要领的介绍(→ 4-5 页)。引物不必事先磷酸化。

② 关于模板质粒

一般情况下可以使用 JM109、DH5 α 等 Dam⁺ 大肠杆菌来源的质粒。不能使用 Dam Methylase(-) 菌株来源的质粒。

→ 结果示例

① 缺失及插入突变效率的比较

以 7.3kb 的质粒 FLJ32066 为对象,用本试剂盒和 A 公司的 non-PCR 法试剂盒进行 90 碱基的缺失突变,以及用于 6 × His 的 18 碱基的导入。结果可见,用其他公司试剂盒很难做成功的缺失和插入等突变导入,用本试剂盒可高效率地得到突变体。

● 90bp 缺失

	测序的克隆数	有目的突变的克隆数	有目的突变的比例
本试剂盒	16	14	88%
A公司试剂盒	16	7	44%

● 18bp 插入

	测序的克隆数	有目的突变的克隆数	有目的突变的比例
本试剂盒	16	15	94%
A公司试剂盒	16	0	0%

② 目的外突变 (2nd-site mutation) 插入频率的评价

以试剂盒附带的对照质粒 (4.3kb) 为模板进行突变导入 (PCR 8Cycles), 从得到的产物中随机选取 24 个克隆, 以 2000bp 长度分成几段分别进行测序。结果可见,使用本试剂盒,实际解析的 48000 个碱基中,只有一个目的外碱基发生突变。

	突变导入率	确认的克隆数	总测序碱基数	目的外的突变碱基数	目的外突变插入率 (x10 ⁻⁵)
本试剂盒	>80%	24	48000	1	2.08
A公司试剂盒	>80%	24	48000	2	4.16

→ 相关产品

① 高保真性 PCR 酶

KOD -Plus- / KOD -Plus- Ver.2	-	-	-	→ 2-20 页
-------------------------------	---	---	---	----------

高效率单管型连接试剂。只需与样品混合即可，非常方便！

高效率连接试剂

Ligation high

Code: LGK-101

375 μ l \times 2支

¥ 550

本试剂是 T4 DNA 连接酶为主体的高效率单管型连接试剂，广泛地应用于各种 DNA 末端的连接反应。

→ 特征

① 简便

用本试剂盒进行反应，只需在 DNA 样品溶液中混入 Ligation high，便可立即进行连接反应。

② 高效率

与单独使用 T4 DNA 连接酶相比，可获得 50 倍以上的效果。

③ 高稳定性

经实验确认即使反复进行 50 次的冻结 / 融解，也不会降低连接反应的效率。

→ 用途: DNA 连接

→ 说明

为了提高反复冻结 / 融解时的稳定性和反应效率，对组成条件进行了最优化。连接反应必需的反应缓冲液、rATP 和 DTT 等已全部包含在本产品里面，只需加入 DNA 样品溶液的一半到相同量的 Ligation high，就可以得到比单独使用 T4 DNA 连接酶更好的结果。

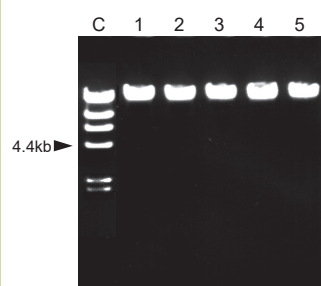
→ 几点建议

① 关于 TA 克隆

T 载体与 PCR 产物的连接反应，16°C 条件下 16 小时以上效果较好。

→ 结果示例

① 反应时间的探讨



使用 λ Hind III 在 16°C 下进行连接反应，EtOH 沉淀后进行电泳。
结果显示，Ligation high 在 5 分钟内完成了连接反应。

C: 未处理
1: 5min.
2: 10min.
3: 20min.
4: 30min.
5: 1hr.

产品内容:

Ligation high 375 μ l \times 2 支

※ 1 次使用量为 7.5 μ l 的情况下，可使用 100 次。

保存:

-20°C

参考文献:

1) R. L.Hawkins et al., *Current Microbiol.*, **38**:335-341(1999)

商品使用文献:

1) H.Kamiya et al., *Nucleic Acids Research*, **28**(7):1640-1646.(2000)
2) H.Kamiya et al., *Biol.Pharm. Bull.*, **27**(5):621-623(2004)
3) Tatsuya Suzuki et al., *Analytical Sciences*, **23**(1):65-70(2007)

基本反应条件:

载体 DNA+ 目的 DNA 15 μ l
Ligation high 7.5~15 μ l

↓
16°C, 30-60min.

↓

在 100 μ l 的感受态细胞中加入 ~10 μ l 的反应液进行转化。

※ 用电泳获得的产物，需进行脱盐处理或通过乙醇沉淀法等将 DNA 纯化后再使用。

注意:

作为稳定剂使用的 BSA 可能会形成沉淀。但对反应没有影响。

→ 相关产品

① 高效率DNA片段抽提试剂盒

MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页
-----------------------------------	---------	--------	--------	----------

② 高效率连接试剂盒

Ligation high Ver.2	LGK-201	200 μ l \times 1 支	¥750	→ 4-11 页
---------------------	---------	--------------------------	------	----------

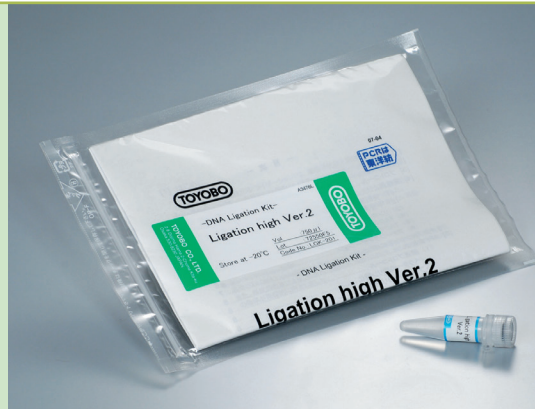
TA 克隆效率得到了飞跃性的提高。即便在 -20°C 也不会冻结，使用非常简便。

高效率连接试剂

Ligation high Ver.2

Code: LGK-201 750 μl \times 1支 ¥ 750

本试剂是 T4 DNA 连接酶为主体的高效率单管型连接试剂。广泛地应用于各种 DNA 末端的连接反应。通过对原产品进行改良，可简便地用于各种用途。



产品内容:

Ligation high Ver.2 750 μl \times 1支

※ 每次使用量为 3.75 μl 时，可使用 200 次。

保存:

-20°C

参考文献:

1) R. L.Hawkins et al., *Current Microbiol.*, **38**:335-341(1999)

注意:

- 在 -30°C 以下长期保存，或在冷冻柜的冷气出风口处保存时，可能会产生冻结。但经实验证明，将其融解后使用不影响活性。产生冻结时，可用手指捏着离心管使其融解，但注意不要使其升温。
- 产生白色沉淀时也可按照上述方法将沉淀溶解后正常使用。

基本反应条件:

载体 DNA+ 目的 DNA 7.5 μl
Ligation high Ver.2 3.75~7.5 μl *

↓

16 $^{\circ}\text{C}$, 30min.

↓

在 100 μl 的感受态细胞中加入 ~10 μl 的反应液进行转化。

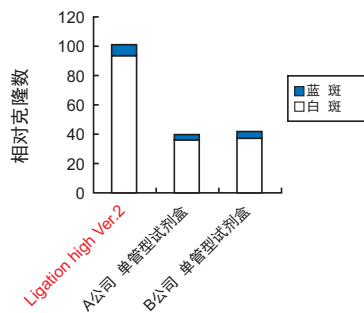
*TA 克隆时 Ligation high Ver.2 为 7.5 μl 。

※ 用电泳获得的产物，需进行脱盐处理或通过乙醇沉淀法等将 DNA 纯化后再使用。

→ 特征

① 高效率

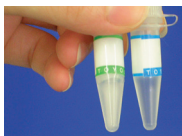
TA 克隆效率得到了大幅度的提高。下图是使用本产品与其他公司试剂盒获得的 TA 克隆效率比较。



② 即便在 -20°C 条件下保存也不会冻结

由于本产品在 -20°C 状态下也不会冻结，因此从 -20°C 冷冻柜中取出后可立即使用，非常节省时间。下面的照片为 -20°C 保存下的试剂状态。

[原有产品: Ligation high < 绿 >、本产品 Ligation high Ver.2 < 蓝 >]。



③ 简便的单管型

使用方法与原有产品一样，只要将试剂和 DNA 片段混合即可，非常简便。

→ 用途: DNA 片段连接反应

→ 说明

本产品是在 Ligation high (→ 4-10 页) 基础上进行改良，使用更加简便的高效率单管型连接试剂。将其与 DNA 片段混合，只需短时间的反应即可发生高效率的连接。可广泛应用于突出末端、平滑末端及 TA 克隆等。

→ 几点建议

① 反应时间

一般推荐 16°C、30 分钟。但普通的突出末端连接通常只需 5 分钟即可完成。当平滑末端或 TA 克隆的反应效率低下时，将反应时间延长至 2 小时左右通常可提高连接效率。结果示例 1 的图记载了连接效率与反应时间相关的数据。

② 反应液带入

盐的带入会影响到连接反应。在 TA 克隆时，未经纯化的 PCR 产物的带入为 0.5~1 μ l (15 μ l 反应体系) 时，可获得很高的连接效率。使用 MagExtractor -PCR & Gel Clean up-([→ 5-10 页](#)) 进行纯化，TA 克隆可获得更高的连接效率。

③ TA 克隆的效率

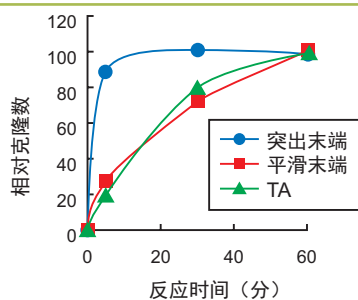
如想获得更高的连接效率，可使用磷酸化的引物进行 PCR。关于引物的磷酸化请参照 [4-4 页](#) 的相关说明

→ 结果示例

① DNA 末端形状与连接效率的关系

在 16°C 条件下反应时，将 DNA 片段 (0.5kb) 的克隆效率与末端形状另外进行比较。结果可见，突出末端的连接约 5 分钟即可完成。而平滑末端及 TA 克隆 30 分钟约完成 70~80%。

另外，平滑末端克隆及 TA 克隆时间超过 1 小时，到 2 小时为止，连接效率会逐渐提高。因此当克隆效率比较低时，可将反应时间提高至 2 小时左右可提高连接效率。

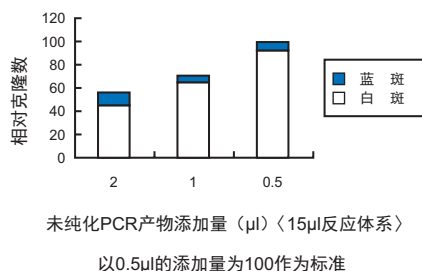


※ 各反应以 60 分钟后的白斑数为 100 作为标准

② 使用未经纯化 PCR 产物的 TA 克隆

将 T 载体 (50ng, 25fmol) 和具有良好扩增效率的未纯化 PCR 产物 (用 Taq DNA Polymerase 扩增的 0.5kb 片段) 按照各种比例混合，在该 DNA 溶液 <7.5 μ l> 中添加 Ligation high Ver.2<7.5 μ l>，在 16°C 条件下反应 30 分钟。然后，用 10 μ l 的反应液对 *E. coli* DH5 α 感受态细胞 <100 μ l> 进行转化，用 LB/Amp(X-Gal) 培养基培养后点克隆数。结果可见，尽量少带入 PCR 反应液可得到良好的结果。

由于用纯化后的 DNA 片段可得到高效率，当效率低下时，可使用纯化后的 PCR 产物。



以 0.5 μ l 的添加量为 100 作为标准

→ 相关产品

① 高效率 DNA 片段抽提试剂盒

MagExtractor -PCR & Gel Clean up-	NPK-601	200 次份	¥1,200	→ 5-10 页
-----------------------------------	---------	--------	--------	----------

以耐热性及比活性都非常优秀的 Thermo T7 RNA Polymerase 为基础的高效转录试剂。

高效率 RNA 合成试剂盒

ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit

Code: TSK-101 60次份×1 ¥1,300

以高耐热性 RNA 合成酶「Thermo T7 RNA Polymerase 《TT7》(→4-15页)」为基础的 RNA 合成量大幅提高的高效率 RNA 合成试剂盒。



产品内容:

Thermo T7 RNA Polymerase	60 μl
10 × Basal Reaction Buffer	400 μl
5 × Accelerator Solution	400 μl
25mM rNTPs Mixture	280 μl
RNase Inhibitor(40U/μl)	30 μl
Nuclease-free Water (not DEPC treated)	1ml

保存:

-20°C

备注:

本产品中添附的 10 × Basal Reaction Buffer 与 Thermo T7 RNA Polymerase 中添附的 Buffer 组成不同。

网络版追加信息:

- 简要备注
- 实验例
- 基本反应条件

参考文献:

- 1) K.Ishikawa et al.,*Nucl.Acids Res.*,**33**:e112(2005)
- 2) M.Itoh et al.,*Nucl.Acids Res.*,**30**:5452-5464(2002)
- 3) M.Chamberlin and J.Ring,*J.Biol.Chem.*,**248**:2235(1973)
- 4) M.Chamberlin and J.Ring,*J.Biol.Chem.*,**248**:2245(1973)

→ 特征

① 高效率

通过添加 Accelerator Solution 可制备比以往高 2~4 倍的高浓度的 RNA。

② 绝佳的耐热性

采用高热稳定性的 Thermo T7 RNA Polymerase 《TT7》，与野生型 T7 RNA Polymerase 相比，具有更高的耐热性。

③ 最适合用于无细胞体外蛋白合成用的 mRNA 合成

最适合用于无细胞体外蛋白合成用的 mRNA 合成。

→ 用途

① 从环状及线性 DNA 模板出发进行 in vitro translation 反应时的 mRNA 的制备

② 大量合成 tRNA、rRNA、ribozyme 及 anti-sense RNA 等

③ RNAi 用双链 RNA 的合成

④ RNA splicing 反应的前体的合成

⑤ Hybridization Assay 用的高标记 RNA 探针的合成

⑥ 合成以 Cap 类似物为引物的具 Cap 构造的 mRNA

→ 说明

本试剂盒中的 Accelerator Solution 可保证实验获得比以往提高 2~4 倍浓度的 RNA。
本试剂盒中采用的 Thermo T7 RNA 多聚酶根据野生型导入突变，比野生型具有更高的热稳定性，可在大范围温度内进行反应，且在 37°C 的比活也有了大幅度的提高。

→ 相关产品

① 高效率 T7 RNA Polymerase

Thermo T7 RNA Polymerase<<TT7>>	-	-	-	→ 4-15 页
② RNase抑制剂				
RNase Inhibitor	-	-	-	→ 3-16 页

TOYOBO 公司 DNA 多聚酶特性一览表

多聚酶比较表

	DNA Polymerase I	Klenow Fragment	T4 DNA Polymerase	Taq DNA Polymerase	Tth/rTth DNA Polymerase	Δ Tth [®] DNA Polymerase	KOD DNA Polymerase	KOD Dash [®]	KOD -Plus-	Blend Taq	Blend Taq -Plus-
<反应>											
DNA多聚酶活性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
双链DNA 5'→3'核酸外切酶活性	+	-	-	±	±	-	ND	ND	ND	+	+
双链DNA 3'→5'核酸外切酶活性	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
单链DNA 3'→5'核酸外切酶活性	+	+	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
RNaseH活性	+	-	-	ND	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
从双链模板进行链的置换反应	+	+	-	+	+	-	ND	ND	ND	+	+
Nick Translation活性	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Exchange活性	+	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<模板>											
双链DNA	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
与引物结合的单链DNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
与引物未结合的单链DNA	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
有gap或具有5'突出末端的DNA	+	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	+	+
有nick的双链DNA	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
单链RNA	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<要求性>											
二价阳离子	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺
SH试剂	+	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
其他											
<酶特性>											
分子量	109kDa	76kDa	141kDa	90kDa	85kDa	58kDa	90kDa	90kDa	90kDa	90kDa	90kDa
组成亚单元数	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
伸长率 (bases/sec.)	约30	约30	约100	约60	约60	约40	106-138	106-138	106-138	约60	约60
类似物的摄入	+	+	+++	+	+	+	+	+	+	+	+
最适反应温度	37℃	37℃	37℃	72℃	75℃	75℃	75℃	75℃	75℃	72℃	72℃
最适PH值 (Tris 缓冲液)	7.4 (25℃)	8.4 (25℃)	8.0-9.0 (25℃)	8.0-8.5 (75℃)	8.8 (25℃)	9.0 (25℃)	6.5-7.5 (75℃)	6.5-7.5 (75℃)	6.5-7.5 (75℃)	8-8.5 (75℃)	8-8.5 (75℃)
<用途>											
DNA 3'端的标记	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
DNA 5'端的标记	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nick Translation 导入的标记	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DNA测序	-	+	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
RNA测序	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
使用oligo引入突变	-	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1st链cDNA合成	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
					(Mn ²⁺ 存在下)	(Mn ²⁺ 存在下)					
2nd链cDNA合成	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DNA的平滑化	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
ND: 无数据 PCR酶也可在第2章中参见特性一览表。 (-2-11 页)											

耐热性提高的 T7 RNA polymerase。50°C条件下仍可进行反应。

Thermo T7 RNA Polymerase 《TT7》

Code: TRL-201

7,500U×1支 ¥500

用基因工程学方法对 T7 RNA 多聚酶进行了改良, 提高了耐热性。

→ 用途

- ① 高标记 RNA 探针的制作
- ② RNA splicing 反应前体的制备
- ③ 以 Cap 类似物为引物, 制备具有 Cap 构造的 mRNA
- ④ 制备 in vitro 翻译用的 mRNA

→ 说明

Thermo T7 RNA Polymerase 用基因工程学方法对来源于 T7 phage 的 RNA Polymerase 导入了点变异、提高了耐热性。

相对于野生型 T7 RNA Polymerase, 提高了耐热性, 在高达 50°C下仍可进行反应、并且与野生型 T7 RNA Polymerase 相比, 在 37°C下的比活也有了提高。

→ 原理: 和 T7 RNA Polymerase 相同。

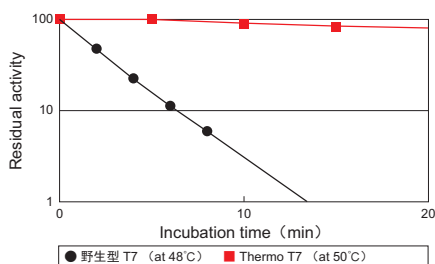
→ 结果示例

① 热稳定性的比较

对野生型 T7 RNA Polymerase 和本酶的热稳定性进行了比较。

将野生型 T7 RNA Polymerase 在 48°C, Thermo T7 RNA Polymerase 在 50°C 下进行温育, 然后测定其残余活性。

结果显示, 野生型 T7 RNA Polymerase 在 48°C 温育 5min. 后, 活性降到了原来的 1/10, 而 Thermo T7 RNA Polymerase 在 50°C 孵化 15min. 后活性仍未见下降。



50°C时的半衰期

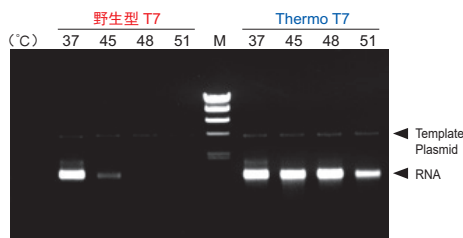
野生型 T7 RNA Polymerase < 1.9min.

Thermo T7 RNA Polymerase 84.5min.

② 高温下 in vitro 转录反应

对野生型 T7 RNA Polymerase 和 Thermo T7 RNA Polymerase 的 in vitro 转录反应效果进行了比较。

以内含 T7 启动子的质粒 0.5μg 为模板, 加入 RNase Inhibitor 20U 和两种酶各 25U, 在 37-51°C 的各温度点进行反应 60min., 然后对反应产物进行电泳。结果显示, Thermo T7 RNA Polymerase 在 51°C 条件下, 仍可以进行转录反应。



产品内容:

Thermo T7 RNA Polymerase (50U/μl) 150μl
10× Buffer 1ml × 2支

组成:

20mM KPO₄ (pH7.5)
100mM NaCl
0.1mM EDTA
5mM DTT
0.01% Triton X-100
50% Glycerol

10× Buffer 组成:

400mM Tris-HCl (pH8.0)
500mM NaCl
80mM MgCl₂
50mM DTT

活性的定义:

以 T7 DNA 为模板, 在 37°C 下, 在 1 小时内将 1nmole 的 [³H]-rNTP 摄入为酸不溶性沉淀物所需的酶量为 1U。

来源:

E. coli 重组体

保存:

-20°C

纯度:

25U 的本酶和 1.5 μg 的 pT7-2 DNA 在 37°C 下反应 2 小时, DNA 的电泳模式未见改变。100U 的本酶和 2.4 μg 的 [³H]-RNA 在 37°C 下反应 2 小时, 生成的酸可溶性分解物在 0.02 μg 以下。

100U 的本酶和 1.7 μg 的 [³H]-T7 DNA 在 37°C 下反应 4 小时, 生成的酸可溶性分解物在 0.02 μg 以下。

参考文献:

- 1) K.Ishikawa et al., *Nucl. Acids Res.*, **33**:e112 (2005)
- 2) M.Itoh et al., *Nucl. Acids Res.*, **30**:5452-5464 (2002)
- 3) M.Chamberlin and J.Ring, *J. Biol. Chem.*, **248**:2235 (1973)
- 4) M.Chamberlin and J.Ring, *J. Biol. Chem.*, **248**:2245 (1973)

基本反应条件:

10× Buffer 5μl
10mM rNTPs 2μl
RNase inhibitor 20U
模板 DNA 100~1000ng
Thermo T7 RNA Polymerase 25~100U
Total Volume 50μl
↓
37~50°C, 30~60min.

→ 相关产品

① 高效率 RNA 合成试剂盒

ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit

-

-

-

→ 4-13 页

② RNase 的抑制

RNase Inhibitor

-

-

-

→ 3-16 页

Note