



08-03

*Convenient TA Cloning System for PCR Products*

**Target Clone<sup>TM</sup>**  
**Target Clone<sup>TM</sup> -Plus-**

(Code No.TAK-101, TAK-201)

使用说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department  
OSAKA JAPAN

## 目 录

[1] 前言 .....	1
[2] 本产品包括内容 .....	2
[3] 操作说明书 .....	3
(1) PCR .....	3
(2) 3'端的dA附加反应 .....	3
(3) 连接 .....	4
(4) 转化 .....	5
(5) 重组体的确认 .....	6
[4] 载体的序列信息 .....	7
(1) pTA2 Vector的Map .....	7
(2) 多克隆位点周边的碱基序列 .....	7
(3) pTA2 碱基序列 .....	8
[5] 常见问题 .....	12
[6] 参考资料 .....	13
(1) 需备培养基和试剂的组成 .....	13
(2) 相关产品 .....	13

### 【 注意 】

本品为科学研究用试剂。请勿作为诊断及临床试剂使用。另外，请在使用本品时遵守实验室的规定，注意安全。

## [1] 前言

以*Taq* DNA多聚酶或*Tth* DNA多聚酶为基础扩增的PCR产物大多在其3'端添加了dA。此时，如果使用在3'端添加dT的T载体，会与PCR产物的dA形成互补，方便进行PCR产物的克隆。这就是TA克隆法的原理。TA克隆法无需使用特别的引物，也无需进行酶切等特别处理，所以作为PCR产物的克隆方法非常普及。

作为常规的TA克隆法，所需连接时间较长，因载体自连而造成较多的假阳性。为了改善这些问题，本公司研发了新型TA克隆试剂盒*TARget Clone<sup>TM</sup>*。本试剂盒具有一下特征。

### 特征

**迅速**：连接反应最短可于5分钟内完成。

**高效**：实现高克隆效率。

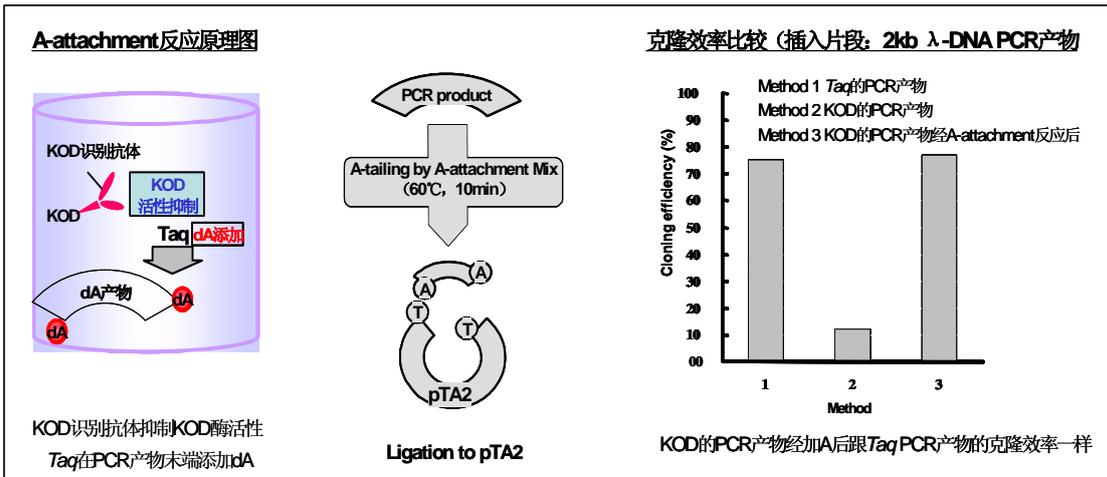
**真实**：载体发生 self-ligation 时，显示阴性（蓝色），可降低假阳性的发生可能。另外，可进行最长 12kb 的扩增产物的克隆。

另外，由本公司的KOD DNA多聚酶等系列的高保真性DNA多聚酶扩增的PCR产物因其Proof Reading活性，多呈平滑末端。通常，为了用TA克隆法进行有效克隆，在将PCR产物进行纯化后，还需要通过*Taq* DNA多聚酶在3'端附加dA。为了使KOD系列的扩增PCR产物无需通过纯化即可进行TA克隆，我们开发了“A-attachment Mix”。同上述TA克隆试剂盒结合，即可成为KOD系列扩增产物专用的TA克隆用试剂。（*TARget Clone<sup>TM</sup> -Plus-*）。

### A-attachment Mix 的特征

**简便**：仅需向KOD系列的扩增PCR产物里添加A-attachment Mix于60℃,进行10分钟反应即可。无需进行PCR产物的纯化。

**高效**：用*Taq* DNA多聚酶的PCR产物进行TA克隆时，也可得到同样的克隆效率。



## [2] 本产品包括内容

品名	code	使用次数	保存温度	内容
<i>TArget Clone<sup>TM</sup></i>	TAK-101	10回用	-20℃	10μl pTA2 Vector (50ng/μl) 50μl 2×Ligation Buffer 10μl T4 DNA Ligase
<i>TArget Clone<sup>TM</sup> -Plus-</i>	TAK-201			10μl pTA2 Vector (50ng/μl) 50μl 2×Ligation Buffer 10μl T4 DNA Ligase 10μl 10×A-attachment Mix

注) pTA2 Vector 和2×Ligation Buffer于室温溶解后, 进行spin down, 然后立即置于冰浴。因为pTA2 Vector的dT突出末端不稳定, 所以请避免长时间放置于室温状态以及避免反复冻溶。

(反复冻溶10次以内, 可认为不会引起性能降低)

注) 关于T4 DNA Ligase和10×A-attachment Mix, 请于使用前进行spin down, 然后立即置于冰浴。另外, 使用后, 请于-20℃保存。

<其他另需试剂>

LB 培养基: 100mg/ml 氨苄青霉素, 100mM IPTG, 4% X-gal

### [3] 操作说明书

此处所提供的是使用本产品时的标准操作。

#### (1) PCR

**Step1.** 使用*Taq* DNA多聚酶, *Tth* DNA多聚酶, KOD DNA多聚酶, 对目标DNA进行扩增。扩增条件自行设定。为了确保PCR产物的3'端加A, PCR的最后步骤请设定为72℃, 5~10分钟的延伸反应。

注) 因为3'-dA不稳定, PCR完成后立即使用或于(-20℃)保存, 请避免长时间置于室温状态。另外, 请避免反复冻溶。

**Step2.** 取一部分反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 确认是否有目的PCR产物。另外, DNA染色后, 将PCR产物条带的浓度同分子量marker的条带的浓度进行比较, 估算大致的DNA量。

**Step3.** 根据需要进行PCR产物纯化。通常不需要进行PCR产物纯化, 如果PCR产物纯度较低或反应液含有连接反应阻碍物, 可以通过纯化得到改善。

注) 进行PCR产物的3'端加dA反应时, 不需进行PCR产物的纯化, 可直接进行以下(2)的向3'端加dA的反应(仅限使用*TARGet Clone™ -Plus-*的场合)。

注) 对于PCR产物的纯化, 推荐使用本公司的DNA fragment纯化试剂盒“MagExtractor® -PCR & Gel Cleanup-”(Code No.:NPK-600, 50次用)。使用该试剂盒, 只需约5分钟就能完成PCR产物的纯化。

#### (2) 3'端的dA附加反应 (使用*TARGet Clone™ -Plus-*时)

- 不进行dA附加反应时, 请进行以下(3)的连接反应。
- 3'端的dA附加反应须在连接反应前进行。

**Step1.** 取KOD系列的扩增产物9μl置于新的试管中。

注) 无需对PCR产物进行纯化。如果使用纯化后的PCR产物, 添加试剂至最终浓度为1X *Taq* buffer, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTPs, 继续下步操作。

**Step2.** 添加10x A-attachment Mix 1μl, 并充分搅拌。

**Step3.** 于60℃进行10分钟反应。

注) 如果担心反应效率不够, 可将反应时间延长至30分钟(一般情况下, 10分钟的反应时间就足够了, 但30分钟可得到最大的附加效率)。

**Step4.** 将反应液的一部分用于连接反应。

注) 反应液请置于冰浴或4℃保存。

### (3) 连接

**Step1.** 取出pTA2 Vector, 2×Ligation Buffer, T4 DNA Ligase。

注) 将pTA2 Vector 和2×Ligation Buffer于室温溶解后, 必须进行spin down, 然后冰浴放置。特别由于pTA2 Vector的dT突出末端不稳定, 请避免长时间放置于室温。另外, 也请避免反复冻溶(反复冻溶10次以内, 不会引起性能降低)。

**Step2.** 按以下组成配制连接液。

组成	连接液
灭菌蒸馏水	(3-x) $\mu$ l
2×Ligation Buffer	5 $\mu$ l
pTA2 Vector (50ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
PCR产物(克隆的对象)	x $\mu$ l
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ l
	10 $\mu$ l

注) 加入的PCR产物量根据PCR产物的浓度、纯度、大小, DNA序列等的不同而不同, 通常pTA2 Vector 和PCR产物mole比可设定为1: 3, 一般都可以得到很好的结果。pTA2 Vector的浓度为50ng/ $\mu$ l、大小约3.0kb, 所以请使用通过以下公式求的X $\mu$ l以上的PCR产物。

$$X = 50 \times Y \div Z \quad (Y \text{ kb: PCR产物的大小、} Z \text{ ng/}\mu\text{l: PCR产物浓度)}$$

例) 将20ng/ $\mu$ l 的PCR产物(0.5kb)按3: 1的mole比配制反应液, 根据公式 $50 \times 0.5 \div 20 = 1.25 \mu$ l。如果PCR产物量过少, 会导致克隆效率下降。请务必注意。

**Step3.** 将反应液于室温(15~25℃)进行30分钟反应。

注) 连接较短DNA片断(2kb以下), 通过5分钟反应就能得到充分的克隆效率。

另外, 如果延长反应时间, 可提高克隆效率。如果进行过夜(12~18小时左右)反应时, 请于4℃进行。

#### (4) 转化

- 此处为使用本公司的感受态细胞（Competent high JM109（Code No.: DNA - 900）、Competent high DH5α（Code No.: DNA - 903））时的操作顺序。  
详细请参考产品内附的说明书。

**Step1.** 将Competent Cell（100μl）于冰浴中融解。

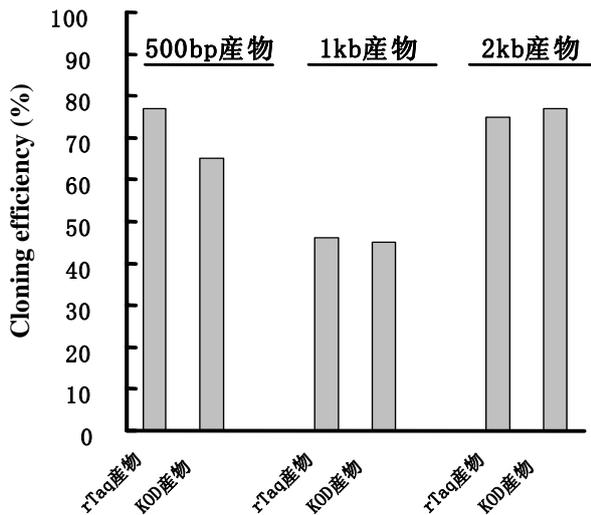
**Step2.** 加入10μl连接液，轻轻混匀后置于冰浴30分钟。

**Step3.** 42℃，30秒热休克后，冰浴冷却2分钟。

**Step4.** 加SOC培养基900μl，于37℃振动培养1小时。

**Step5.** 取适量涂于LB/AP/IPTG/X-gal板上，于37℃过夜培养。通过蓝白判定挑出白色重组菌落。

注）建议每块板上涂20~100μl，必要时可以多涂几块板。



PCR产物	插入DNA		
	500bp	1kb	2kb
r Taq产物 (TAK-101使用)	10,400	4,700	1,800
KOD-Plus产物 (TAK-201使用)	8,950	4,300	2,230

连接反应： 24℃， 5 分钟  
感受态细胞： *E.coli* DH5α (1 x 10<sup>9</sup> cfu/μg) (TAK-101 使用)

## (5) 重组体的确认

### 菌落直接PCR

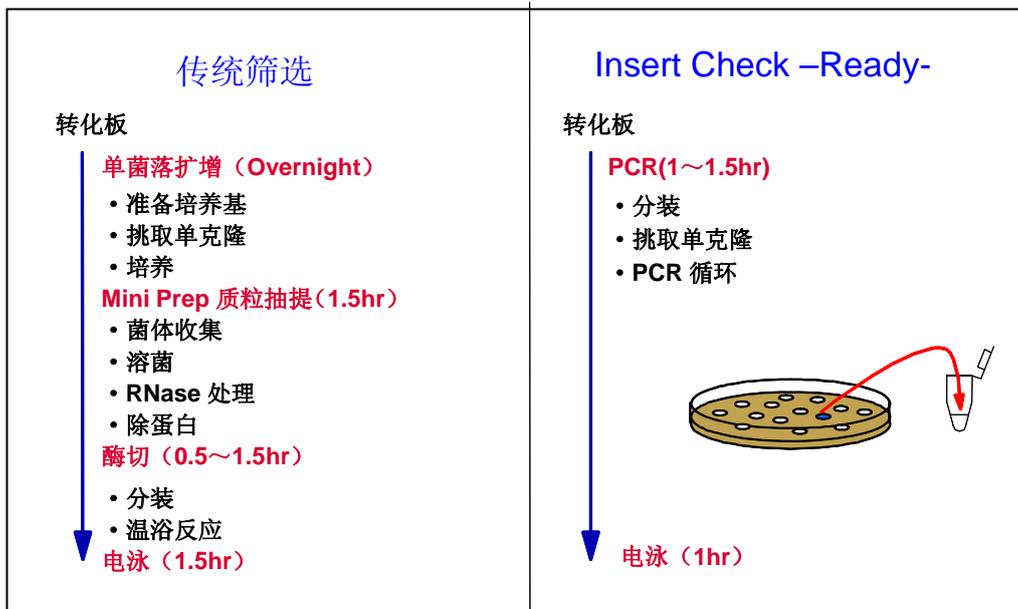
确认含有目标DNA片断重组体的最简便的方法是直接PCR的检测方法。如果使用本公司的菌落直接PCR用Premix试剂“Insert Check -Ready-” (Code No.: PIK-101)、“Insert Check -Ready- Blue” (Code No.: PIK-201; 含Loading Dye), 可以在短时间 (2~4 小时) 内确认目标重组体。

这里的操作顺序是使用Insert Check -Ready- Blue时的情况。详细内容请参考产品内附说明书。

<Insert Check -Ready- Blue (Code No.: PIK-201) 的使用方法>

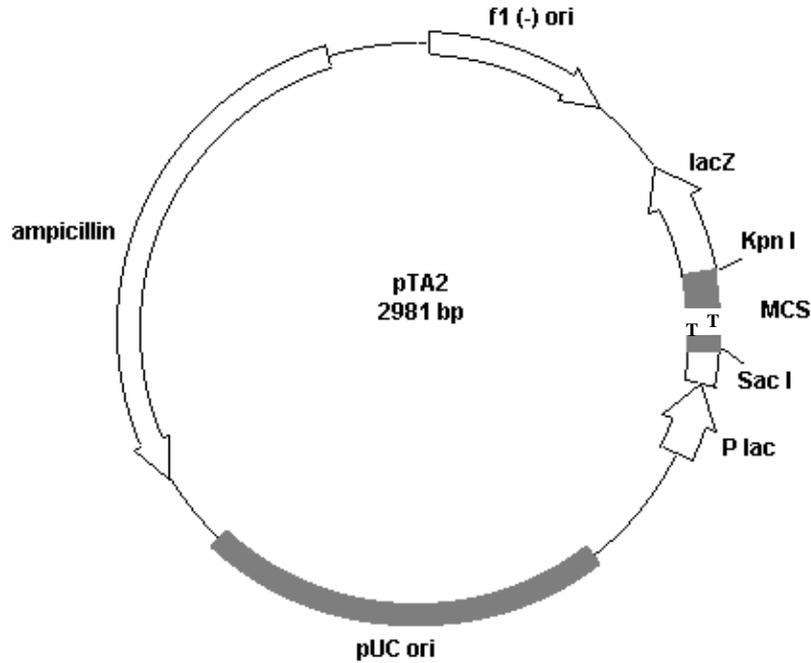
- Step1. 将融解后的Insert Check -Ready- Blue 50 $\mu$ l 加入PCR管。
- Step2. 用牙签或枪头沾取菌落。
- Step3. 将牙签或枪头放入Insert Check -Ready- Blue中, 将菌体洗入。
- Step4. 根据需要加入矿物油, 盖上盖子, 设定PCR仪, 进行PCR。
- Step5. PCR结束后, 取部分反应液直接点样, 进行电泳。根据电泳结果判定阳性克隆。

- 之后, 将对应的阳性克隆进行培养, 抽提质粒DNA。推荐使用本公司的DNA抽提试剂盒“MagExtractor<sup>®</sup> -Plasmid-”抽提质粒DNA。

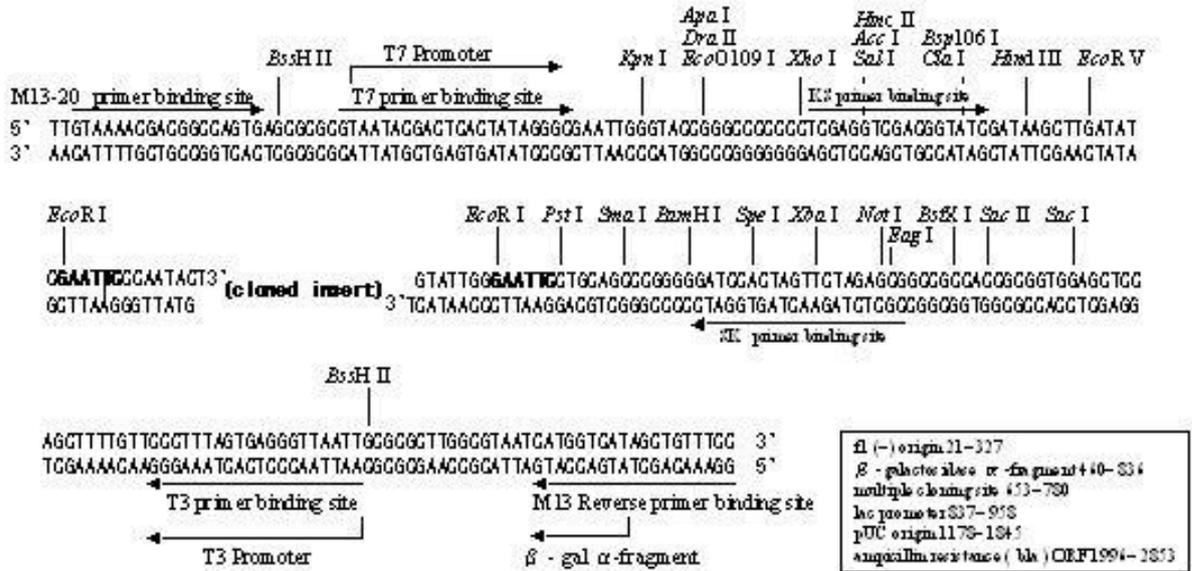


## [4] 载体的序列信息

### (1) pTA2 Vector 的 Map



### (2) 多克隆位点周边的碱基序列



多克隆位点周边的碱基序列

( 3 ) pTA2 碱基序列 (2981 bp)

```

1  CTGACGCGCC CTGTAGCGGC GCATTAAGCG CGGCGGGTGT GGTGGTTACG
51  CGCAGCGTGA CCGCTACACT TGCCAGCGCC CTAGCGCCCG CTCCTTTCGC
101 TTTCTTCCCT TCCTTTCTCG CCACGTTCGC CGGCTTTCCT CGTCAAGCTC
151 TAAATCGGGG GCTCCCTTTA GGGTTCCGAT TTAGTGCTTT ACGGCACCTC
201 GACCCCAAAA AACTTGATTA GGGTGTATGGT TCACGTAGTG GGCCATCGCC
251 CTGATAGACG GTTTTTTCGCC CTTTGACGTT GGAGTCCACG TTCTTTAATA
301 GTGGACTCTT GTTCCAAACT GGAACAACAC TCAACCTAT CTCGGTCTAT
351 TCTTTTGATT TATAAGGGAT TTTGCCGATT TCGGCCTATT GGTAAAAAAA
401 TGAGCTGATT TAACAAAAAT TTAACGCGAA TTTTAACAAA ATATTAACGC
451 TTACAATTC CATTTCGCCAT TCAGGCTGCG CAACTGTTGG GAAGGGCGAT
501 CGGTGCGGGC CTCTTCGCTA TTACGCCAGC TGGCGAAAGG GGGATGTGCT
551 GCAAGGCGAT TAAGTTGGGT AACGCCAGGG TTTTCCCAGT CACGACGTTG
601 TAAAACGACG GCCAGTGAGC GCGCGTAATA CGACTACTA TAGGGCGAAT
651 TGGGTACCGG GCCCCCCCTC GAGGTCGACG GTATCGATAA GCTTGATATC
701 GAATTCCCAA TAC*GTATTGGGAATTCCTGC AGCCCGGGGG ATCCACTAGT
751 TCTAGAGCGG CCGCCACCGC GGTGGAGCTC CAGCTTTTGT TCCCTTTAGT
801 GAGGGTTAAT TGCGCGCTTG GCGTAATCAT GGTCATAGCT GTTTCCTGTG
851 TGAAATTGTT ATCCGCTCAC AATTCCACAC AACATACGAG CCGGAAGCAT
901 AAAGTGTAAG GCCTGGGGTG CCTAATGAGT GAGCTAACTC ACATTAATTG
951 CGTTGCGCTC ACTGCCGCT TTCCAGTCGG GAAACCTGTC GTGCCAGCTG
1001 CATTAATGAA TCGGCCAACG CGCGGGGAGA GGCGGTTTGC GTATTGGGCG
1051 CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC
1101 GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT ATCCACAGAA
1151 TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAAGGCC AGCAAAAAGGC
1201 CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC
1251 CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC
1301 CCGACAGGAC TATAAAGATA CCAGGCGTTT CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT
1351 GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC
1401 TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCATA GCTCACGCTG TAGGTATCTC
1451 AGTTCGGTGT AGGTCGTTTC CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCC
1501 CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA
1551 ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGTAACAGG
1601 ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG
1651 GCCTAACTAC GGCTACTACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC TCGCTCTGCT
1701 TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA
1751 CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGTTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC
1801 GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT
1851 CTGACGCTCA GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTATGAGA
1901 TTATCAAAAA GGATCTTAC CTAGATCCTT TTAAATTAAA AATGAAGTTT
1951 TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC AGTTACCAAT
2001 GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT TCCTTCATCC

```

2051 ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT  
 2101 ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCGG  
 2151 CTCCAGATTT ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA  
 2201 AGTGGTCCTG CAACTTTATC CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG  
 2251 GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA TAGTTTGCGC AACGTTGTTG  
 2301 CCATTGCTAC AGGCATCGTG GTGTCACGCT CGTCGTTTGG TATGGCTTCA  
 2351 TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCCA GTTACATGAT CCCCCATGTT  
 2401 GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCGTT GTCAGAAGTA  
 2451 AGTTGGCCGC AGTGTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT  
 2501 CTTACTGTCA TGCCATCCGT AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC  
 2551 AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG GCGACCGAGT TGCTCTTGCC  
 2601 CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC TTTAAAAGTG  
 2651 CTCATCATTG GAAAACGTTT TTCGGGGCGA AAACCTCTCA GGATCTTACC  
 2701 GCTGTTGAGA TCCAGTTTCG TGTAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT  
 2751 CAGCATCTTT TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG  
 2801 CAAAATGCCG CAAAAAAGGG AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT  
 2851 CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG CATTATCAG GGTATTGTC  
 2901 TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAATAGGG  
 2951 GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA C

★3'端附加dT的位点

(4) 内切酶切断位点

内切酶	切断部 位数	切断处						
<i>Acc65I</i>	1	653						
<i>AccI</i>	1	674						
<i>AflIII</i>	1	1173						
<i>AhdI</i>	1	2061						
<i>Alw44I</i>	2	1487,	2733					
<i>AlwI</i>	10	739,	740,	1740,	1814,	1826,	1911,	1924, 2388,
		2691,	2709					
<i>AlwNI</i>	1	1584						
<i>ApaI</i>	1	659						
<i>ApoI</i>	3	417,	428,	701				
<i>AvaI</i>	2	668,	733					
<i>AvaII</i>	2	2204,	2426					
<i>BamHI</i>	1	739						
<i>BanI</i>	4	193,	653,	917,	2014			
<i>BanII</i>	3	159,	659,	775				
<i>BciVI</i>	2	1382,	2909					
<i>BfaI</i>	6	81,	746,	752,	1668,	1921	2256	
<i>BglI</i>	2	466,	2180					
<i>BpmI</i>	2	778,	2151					
<i>BsaAI</i>	1	232						
<i>BsaHI</i>	1	2602						
<i>BsaI</i>	1	2133						
<i>BsaII</i>	6	575,	733,	734,	767,	912	1333	

内切酶	切断部 位数	切断处							
<i>Bsa</i> WI	3	1379,	1526,	2357					
<i>Bse</i> MII	4	1448,	1857,	2023,	2563				
<i>Bsi</i> EI	6	497,	758,	1086,	1510,	2433	2582		
<i>Bsi</i> HKAI	4	775,	1487,	2648,	2733				
<i>Bsl</i> I	8	9,	335,	664,	1015,	1189	1207,	1373,	1652
<i>Bsm</i> AI	2	2133,	2898						
<i>Bsp</i> 120I	1	659							
<i>Bsp</i> 1286I	6	159,	659,	775,	1487,	2648	2733		
<i>Bsp</i> HI	2	1893,	2901						
<i>Bsp</i> LU11I	1	1173							
<i>Bsr</i> BI	5	88,	755,	863,	1104,	2905			
<i>Bsr</i> DI	2	2120,	2302						
<i>Bss</i> HII	2	619,	812						
<i>Bss</i> SI	2	1346,	2730						
<i>Bst</i> F5I	4	542,	2046,	2227,	2514				
<i>Bst</i> XI	1	764							
<i>Cfr</i> 10I	2	129,	2146						
<i>Cl</i> aI	1	683							
<i>Csp</i> 6I	2	654,	2545						
<i>Dde</i> I	4	1448,	1857,	2023,	2563				
<i>Dra</i> I	3	1930,	1949,	2641					
<i>Dra</i> III	1	232							
<i>Drd</i> I	2	275,	1275						
<i>Dsa</i> I	1	767							
<i>Eae</i> I	4	609,	758,	1012,	2454				
<i>Ear</i> I	3	511,	1051,	2855					
<i>Ecl</i> 136II	1	775							
<i>Eco</i> 52I	1	758							
<i>Eco</i> 57I	2	1700,	2748						
<i>Eco</i> O109I	1	659							
<i>Eco</i> RI	2	701,	721,						
<i>Eco</i> RII	5	575,	912,	1200,	1321,	1334			
<i>Eco</i> RV	1	695							
<i>Fau</i> I	5	33,	87,	505,	965,	1022			
<i>Fok</i> I	4	542,	2046,	2227,	2514				
<i>Fsp</i> I	2	477,	2286						
<i>Hae</i> II	4	75,	83,	1047,	1417				
<i>Hga</i> I	4	3,	1275,	1853,	2603				
<i>Hinc</i> II	1	674							
<i>Hind</i> III	1	689							
<i>Hinf</i> I	8	282,	304,	632,	1008,	1073	1148,	1544,	2061
<i>Hph</i> I	6	222,	1917,	2144,	2540,	2766	2781		
<i>Kpn</i> I	1	653							
<i>Mae</i> II	8	123,	233,	276,	288,	595	1876,	2292,	2665
<i>Mbo</i> II	8	103,	512,	1052,	1823,	1914	2669,	2747,	2856
<i>Msl</i> I	4	765,	2314,	2473,	2832				
<i>Msp</i> AI	6	527,	767,	995,	1513,	1758	2699		
<i>Mva</i> I	5	575,	912,	1200,	1321,	1334			
<i>Nae</i> I	1	129							
<i>Nci</i> I	6	657,	733,	734,	1552,	2248	2599		
<i>Ngo</i> MIV	1	129							

内切酶	切断部位数	切断处							
<i>NlaIII</i>	8	828,	1174,	1894,	2385,	2395	2473,	2509,	2902
<i>NotI</i>	1	757							
<i>NspI</i>	1	1173							
<i>PleI</i>	6	282,	304,	632,	1073,	1544	2061		
<i>PspI406I</i>	2	2291,	2664						
<i>PstI</i>	1	727							
<i>PvuI</i>	2	497,	2433						
<i>PvuII</i>	2	527,	995						
<i>RsaI</i>	2	654,	2545						
<i>SacI</i>	1	775							
<i>SacII</i>	1	767							
<i>Sall</i>	1	674							
<i>SapI</i>	1	1050							
<i>Sau96I</i>	8	240,	507,	659,	660,	2108	2187,	2204,	2426
<i>ScaI</i>	1	2544							
<i>SchI</i>	6	282,	304,	632,	1073,	1544	2061		
<i>SfaNI</i>	4	1261,	2313,	2523,	2753				
<i>SfcI</i>	6	11,	638,	727,	1438,	1629	2307		
<i>SmaI</i>	1	733							
<i>SmlI</i>	5	668,	1279,	1541,	1818,	2686			
<i>SpeI</i>	1	745							
<i>SspI</i>	2	440,	2868						
<i>TaaI</i>	8	258,	483,	678,	1135,	1206	1676,	1989,	2504
<i>TaiI</i>	8	123,	233,	276,	288,	595	1876,	2292,	2665
<i>TaqI</i>	7	199,	669,	675,	684,	699	1273	2717	
<i>TatI</i>	1	2544							
<i>TfiI</i>	2	1008,	1148						
<i>Tsp45I</i>	4	57,	589,	2323,	2534				
<i>TspRI</i>	10	613,	960,	1069,	1575,	1588	1859,	2008,	2113,
		2460,	2487						
<i>VspI</i>	3	943,	1002,	2237					
<i>XbaI</i>	1	751							
<i>XhoI</i>	1	668							
<i>XhoII</i>	7	739,	1814,	1825,	1911,	1923	2691	2708	
<i>XmaI</i>	1	733							
<i>XmnI</i>	1	2661							

## 没有切断部位的内切酶

<i>AatII</i>	<i>AccIII</i>	<i>AflIII</i>	<i>AgeI</i>	<i>AscI</i>
<i>BbeI</i>	<i>BbsI</i>	<i>BbvCI</i>	<i>BclI</i>	<i>BglII</i>
<i>BlnI</i>	<i>Bpu10I</i>	<i>Bpu1102I</i>	<i>BsaBI</i>	<i>BseRI</i>
<i>BsgI</i>	<i>BsiWI</i>	<i>BsmBI</i>	<i>BsmFI</i>	<i>BsmI</i>
<i>BspMI</i>	<i>BsrGI</i>	<i>Bst1107I</i>	<i>BstAPI</i>	<i>BstBI</i>
<i>BstEII</i>	<i>Bsu36I</i>	<i>Eco47III</i>	<i>Eco72I</i>	<i>EcoNI</i>
<i>EheI</i>	<i>FseI</i>	<i>HpaI</i>	<i>KasI</i>	<i>MluI</i>
<i>MscI</i>	<i>MunI</i>	<i>NarI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NdeI</i>
<i>NheI</i>	<i>NruI</i>	<i>NsiI</i>	<i>PacI</i>	<i>PmeI</i>
<i>Ppu10I</i>	<i>PpuMI</i>	<i>PshAI</i>	<i>RsrII</i>	<i>SanDI</i>
<i>SbfI</i>	<i>SexAI</i>	<i>SfiI</i>	<i>SgfI</i>	<i>SgrAI</i>
<i>SnaBI</i>	<i>SphI</i>	<i>SrfI</i>	<i>StuI</i>	<i>StyI</i>
<i>SwaI</i>	<i>Tth111I</i>	<i>Van9II</i>	<i>XcmI</i>	

## [ 5 ] 常见问题

问题	可能原因	说明
得不到菌落	感受态细胞效率不高	请使用具有 $10^8$ cfu/ $\mu$ g pBR322 以上的转化效率的感受态细胞。
	板上的抗生素浓度过高	向板上加入终浓度为50-100 $\mu$ g/ml的AP。
菌落过多	板上的抗生素浓度不足	向板上加入终浓度为50-100 $\mu$ g/ml的AP（含有AP的板可于4℃保存约一个月）。
几乎没有白色菌落或白色菌落过少	PCR产物中加A产物过少	使用Taq多聚酶、Tth多聚酶以外的DNA多聚酶时，请确认是否进行过加A反应。 在使用Taq多聚酶、Tth多聚酶时为了确保PCR产物末端加A，也请追加PCR最后的72℃，5-10分钟的伸长反应。因为3'-dA不稳定，所以在PCR结束后请立即使用PCR产物，或于-20℃保存，请避免室温放置。 通过10x A-attachment Mix的dA附加反应仅对应于KOD系列扩增的PCR产物。对由其他PCR酶扩增出的PCR产物进行dA附加反应时，请进行PCR产物的纯化后实施dA附加反应。对应PCR产物的纯化，推荐本公司DNA fragment纯化试剂盒“MagExtractor <sup>®</sup> -PCR & Gel Clean up-”。
	载体的d T突出末端分解	请尽量避免pTA2 Vector于室温放置或冻融。
	连接反应时间短	请将连接反应时间延长至2小时。或4℃过夜。
	反应温度过高	请将连接反应温度控制在25℃以内。超过25℃会影响得到白色菌落的得率。
	插入DNA的浓度低	浓缩插入DNA。 将载体的使用量调节至1/2~1/5进行连接反应。
	PCR产物量不足	根据不同的PCR产物的浓度、纯度、大小、DNA序列等改变反应液配比，mole比请设为pTA2 : PCR产物 = 1 : 3以上。
	PCR产物中含有杂质，阻碍TA连接反应	进行PCR产物的纯化。关于PCR产物的纯化推荐本公司的DNA fragment纯化试剂盒“MagExtractor <sup>®</sup> -PCR & Gel Clean up-”。
	PCR产物因UV过量照射产生嘧啶二聚体	请注意将PCR产物从凝胶中切出时，UV照射时间不可过长。推荐使用长波长的UV光源。
	有时即便插入PCR产物，仍然产生蓝色菌落	通过检查较淡的蓝色菌落，可以得到重组体。
几乎或全部是白色菌落	由于IPTG, X-gal浓度低而无法进行蓝白判定	请确认LB/AP/IPTG/X-gal板的性能。另外请再度确认AP, IPTG, X-gal的使用浓度。

有白色菌落, 但是没有目标长度的片断插入	目标片断的扩增量少	请增加用于连接反应的PCR产物的量。本产品可使用最大3μl的PCR产物。 目标片断的扩增出现非特异性, 请再检查PCR条件。
	PCR产物里含有较多引物二聚体	请进行PCR产物的纯化。关于PCR产物的纯化推荐本公司的DNA fragment纯化试剂盒“MagExtractor® -PCR & Gel Clean up-”。本试剂盒对于引物二聚体等的短链DNA (大约50bp以下) 的去除相当有效。 利用菌落直接PCR, 选择含有目标长度的片断。

## [ 6 ] 参考资料

### (1) 需备培养基和试剂的组成

- ① LB培养基: 将10g bacto-tryptone, 5g bacto-yeast extract, 10g NaCl 于1L蒸馏水中融解, 用NaOH调至pH7.2。
- ② 100mM IPTG: 将0.24g IPTG融解于蒸馏水, 终量为10ml。过滤灭菌后于-20℃保存。
- ③ 4% X-gal: 将0.4g X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 于N,N-dimethyl-formamide内溶解, 终量10ml。于-20℃遮光保存。
- ④ LB/AP/IPTG/X-gal板: 向LB/AP板上涂布100mM IPTG, 4% X-gal各20μl, 干燥后待用。

### (2) 相关产品

Code No.	品 名	内 容
TAP-211	<i>rTaq</i> DNA Polymerase <内含 Mg>	250U
TTH-301	<i>rTth</i> DNA Polymerase	250U
KOD-201	KOD -Plus-	250U
LDP-101 LDP-101B	KOD Dash	250U 250U×5 支
BTQ-101 BTQ-101B	Blend Taq™	250U 250U×5 支
BTQ-201 BTQ-201B	Blend Taq™ -Plus-	250U 250U×5 支
FSK-100 FSK-100B	ReverTra Ace -α-® < First Strand cDNA 合成试剂盒>	50 次 50 次×2
NPK-300 NPK-301	MagExtractor® -Plasmid- <磁珠型 Plasmid DNA 纯化试剂盒>	50 次 100 次
NPK-600 NPK-601	MagExtractor® -PCR & Gel Clean up- <磁珠型 DNA fragment 纯化试剂盒>	50 次 100 次
MGS-101	Magical Trapper <磁珠分离专用台架>	1 台
PIK-101 PIK-201	Insert Check -Ready- Insert Check -Ready- Blue <E.coli 菌落直接 PCR 用 Premix 试剂, Blue 内含 Dye>	1ml×5 支



[制造 · 销售商]

**东洋纺（上海）生物科技有限公司**

**上海市浦东新区张杨路 188 号汤臣商务中心 C 座 310 室**

**邮编：200122**

交货期限 · 订货相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容 · 技术相关咨询

Tel:021-5879-4142 Fax:021-5879-5259

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

代理商资料：