

2019年最新版

基因表达手册

PCR

核酸制备
核酸纯化

表达系统的
选择

克隆

转化·插入
检测

质粒纯化

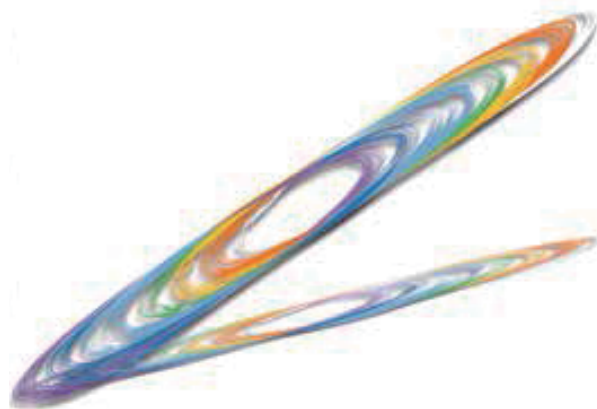
蛋白质纯化

从PCR到蛋白质纯化，Takara Bio
为您的基因表达提供全面支持。

本手册记载了

用于基因表达的相关产品的信息。

是您身边常备的手册！



PCR

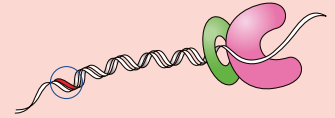
p.3-4

主要介绍2款推荐用于克隆的PCR酶【PrimeSTAR®】和【Tks Gflex™】

【PrimeSTAR®系列】保真性高，适用于长链或GC rich的模板的扩增、高速PCR缩短反应时间

【Tks Gflex™系列】该系列酶能够很好的扩增难扩增的序列、准确性较高

- 关联产品：反转录酶PrimeScript系列



核酸制备·核酸纯化

p.5-6

推荐用于PCR反应模板样品的制备及PCR反应后扩增产物的纯化，此处主要介绍【Spin Column】纯化试剂盒。

- 从细胞、组织、细菌、酵母菌、植物等提取基因组DNA
- PCR产物的纯化及目的片段的切胶回收

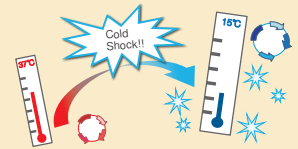


表达系统的选择

p.7-10

大肠杆菌冷休克表达系统，短芽孢杆菌表达系统，人细胞表达载体，无细胞蛋白质合成系统，植物转化用高表达载体等，配备了原理不同的各种蛋白质表达系统。

为获得效率高且回收量高的蛋白质，请选择最适合的表达系统或载体。



克隆

p.11-14

目的DNA片段插入到任意载体的克隆操作，是基因工程实验中经常用到的基础技术之一。此处介绍了标准的操作方法及高效无缝克隆In-Fusion方法。

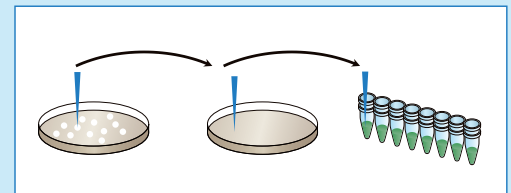
- 限制酶/连接试剂盒（标准方法）
- TA克隆（不需要限制酶即可构建）
- In-Fusion克隆（多个片段任意位置，不需要限制酶处理即可构建）



转化·插入检测

p.15

想要有效的进行基因克隆，感受态细胞的选择也是一个重要的因素。请尝试使用【HST08】。推荐您同时使用操作简单且快速的预混型PCR酶进行插入检测。

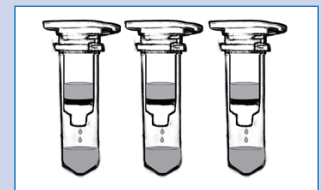


质粒纯化

p.16

根据实验目的，选择相应的产品。

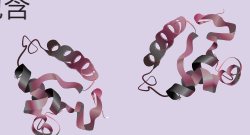
- 想用于miniprep(克隆、转化、测序等)
- 想用于转染
- 用于Endotoxin free转染



蛋白质纯化

p.17-22

His-tag融合蛋白质纯化，已上线的产品包括树脂型的【TALON®系列】和使用新型膜技术室温条件下短时间即可纯化的【Capturem™系列】。【Capturem™系列】同时也包含基于Protein A原理的抗体快速纯化产品。



缩短了克隆/蛋白质表达·纯化的时间

Time Saving产品介绍

【Time Saving产品】，只需将您现在使用的产品更换一下就可以缩短实验时间的产品。

想早一点知道结果并发表成果的您一定要尝试一下。

快速PCR酶缩短反应时间

★详见p.3

产品名称	包装量	Code No.
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	50 μl反应 × 25 次	R045Q
	50 μl反应 × 100 次	R045A
	50 μl反应 × 400 次	R045B (A×4)

特点

- 利用酶自身的高Priming效率和特别添加的延伸因子，可大幅缩短退火时间和延伸时间，实现了高速PCR反应 (5秒/kb~)
- 保真性位于Takara Bio PCR酶榜首

尤其适用于要求长片段、准确扩增的克隆用载体的扩增。且能大幅减少整个PCR反应的时间。

将用于克隆的时间缩短1天

★详见p.13

产品名称	包装量	Code No.
In-Fusion® HD Cloning Kit	10 次	639648

特点

- 进行PCR克隆时不需要使用限制酶进行酶切处理及连接操作。
- In-Fusion反应时间仅15分钟。

与使用限制酶及连接反应试剂盒进行的克隆相比，反应时间约能缩短一天。成功率较高、从而减少了实验失败的重复时间。

仅需5分钟即可纯化His-tag融合蛋白质及抗体的Capturem™膜技术

★详见p.19-22

产品名称	包装量	Code No.
Capturem™ His-Tagged Purification Miniprep Kit	20 次	635710
Capturem™ Protein A Miniprep	12 次	635717

特点

- 使用Capturem™新型膜技术，小量样品纯化从上样至洗脱仅需要5分钟。
- 柱床体积小，洗涤更彻底，并可实现高浓度洗脱。

大幅减少了蛋白质纯化所需的时间和精力。同时配备收量多的Maxi类型，Large Volume类型和适用于高通量的96孔类型产品。

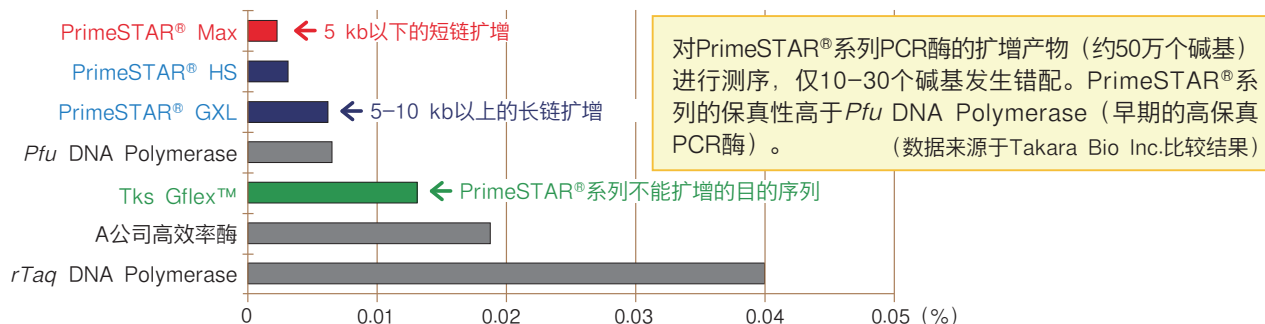
1 克隆的重中之重是保真性！高保真PCR聚合酶PrimeSTAR®系列

【PrimeSTAR®】具有很强的3'→5'外切酶活性，保真性优于Takara Bio的其他任一种PCR酶。此外，该酶兼具很高的反应性能，可谓是克隆用PCR酶的理想选择。

该系列产品包括保真性高、且能快速进行PCR反应的【PrimeSTAR® Max】、能够扩增长链及GC rich样品的【PrimeSTAR GXL®】、无偏差基本型【PrimeSTAR® HS】等，请根据实验目的进行选择。

克隆用PCR酶的理想选择是【PrimeSTAR®】！

◆ 错误率低！PrimeSTAR®系列与其他各种PCR酶的保真性能的比较



对PrimeSTAR®系列PCR酶的扩增产物（约50万个碱基）进行测序，仅10-30个碱基发生错配。PrimeSTAR®系列的保真性高于Pfu DNA Polymerase（早期的高保真PCR酶）。（数据来源于Takara Bio Inc.比较结果）

错配率的计算方法：以GC rich、易发生碱基突变的*T.thermophilus* HB8为模板，任选10个区域进行PCR扩增后，将各自的PCR产物克隆至载体，并对每种序列挑取复数的克隆进行测序确认碱基序列。以错配碱基数对总解析碱基数的比率来测定mutation frequency（突变频率）。

◆ PrimeSTAR®系列的特点

酶	GC或AT rich 模板的扩增	延伸速度	模板添加量范围	扩增片段大小标准 (人基因组DNA)	PCR产物末端形状	Hot Start
PrimeSTAR® HS	★★★★	★★	★★	≤8.5 kb	平滑末端	○ (使用抗体)
PrimeSTAR® Max	★★★★	★★★★★	★★★★ (★)*1	≤6 kb		
PrimeSTAR® GXL	★★★★★	★★★★ (★)*2	★★★★★	≤30 kb		

※1：当延伸时间延长至1 min./kb时，可以增加模板使用量。

※2：当酶的使用量提高至2倍时，可进行延伸速度为10 sec./kb的高速PCR反应。

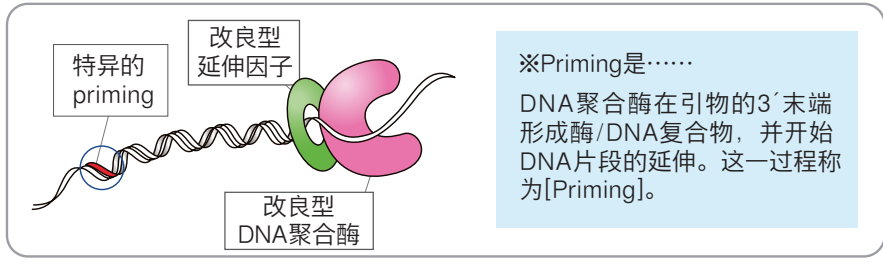
产品名称	包装量	Code No.
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase	50 μl反应 × 40次	R050Q
	50 μl反应 × 200次	R050A
	50 μl反应 × 800次	R050B (A × 4)
PrimeSTAR® GXL Premix	50 μl反应 × 40次	R051S
	50 μl反应 × 200次	R051A
	50 μl反应 × 800次	R051B (A × 4)
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	50 μl反应 × 25次	R045Q
	50 μl反应 × 100次	R045A
	50 μl反应 × 400次	R045B (A × 4)
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	50 U	R010Q
	250 U	R010A
	1,000 U	R010B (A × 4)
PrimeSTAR® HS (Premix)	50 μl反应 × 40次	R040Q
	50 μl反应 × 100次	R040A
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase with GC Buffer	125 U	R044Q
	250 U	R044A
	1,000 U	R044B (A × 4)

推荐

高保真酶PrimeSTAR®系列与In-Fusion HD Cloning Kit组合使用，能够大幅提高克隆效率。特别是使用可进行高速PCR反应的PrimeSTAR® Max，可大幅缩短反应时间，快速进行基因克隆。In-Fusion的详细内容请参考第13页。

2 使克隆更顺利的高性能PCR酶! Tks Gflex™ DNA Polymerase

- 高成功率
- 难以扩增的序列
- 粗提样品



Tks Gflex™ DNA Polymerase对于粗提样品、GC rich · AT rich、长链等难扩增序列也能够进行特异扩增, 是扩增能力很强的PCR酶。通常多利用该酶的高反应性能做【扩增·检出】为目的的PCR, 但是通过在α型Polymerase的基础上进行了改良, 使得该酶的保真性提高(参考p.3图片), 也适用于克隆实验。

对使用PrimeSTAR®扩增困难的目的序列进行克隆时, 可以尝试使用Tks Gflex™ DNA Polymerase。

产品名称	包装量	Code No.
Tks Gflex™ DNA Polymerase	50 U	R060Q
	250 U	R060A
	1,000 U	R060B (A × 4)

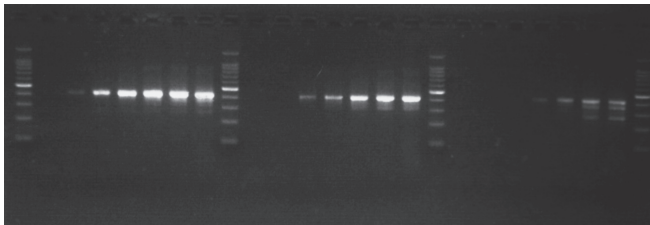
【关联产品】反转录酶【PrimeScript™系列】

能够进行良好克隆的另一个重要因素是PCR模板制备时反转录酶的选择。

PrimeScript RTase通过对酶自身及反应体系的改良, 能够合成高品质的cDNA。

- 能够合成高品质的cDNA
- 42℃反应 (减少mRNA的降解)
- 具有很强的置换延伸活性
- 高级结构的RNA也可以使用

PrimeScript (42℃) A公司酶 (50℃) A公司酶 (55℃)



(数据来源于Takara Bio Inc.比较结果)

以含有高级结构的28S ribosomal RNA为模板, 使用PrimeScript RTase和A公司的反转录酶进行cDNA合成, 比较相同PCR条件下合成的cDNA。PrimeScript RTase显示了更好的灵敏度和扩增效率, cDNA收量较好。

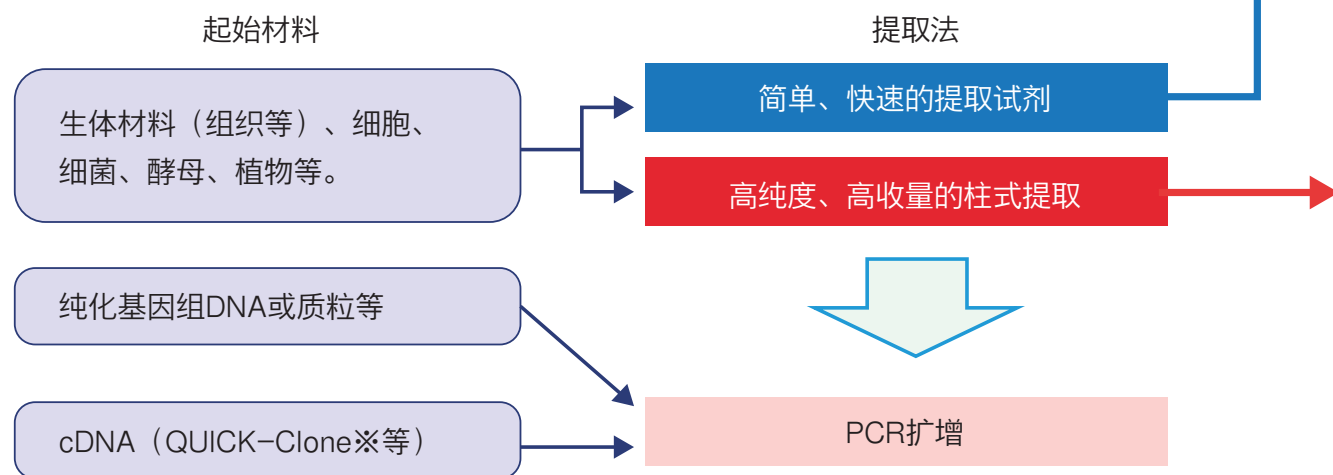
- 目的序列: 人28S ribosomal RNA(GC 70.6%、418 bp)
- RT primer: Specific Primer
- RT温度: PrimeScript 42℃、A公司50℃及55℃
- 作为PCR模板的cDNA量: 从左侧条带开始, total RNA相当量分别为 500 fg、5 pg、50 pg、500 pg、5 ng、50 ng、500 ng。

产品名称	包装量	Code No.
反转录酶及相关cDNA合成试剂盒		
PrimeScript™ Reverse Transcriptase	10,000 U	2680A
PrimeScript™ II Reverse Transcriptase	10,000 U	2690A
PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit	50 次	6210A
PrimeScript™ Double Strand cDNA Synthesis Kit	10 次	6111A
搭配高保真酶的RT-PCR Kit		
PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit	50 次	R023A
	200 次	R023B (A × 4)
PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit	50 次	R026A
	200 次	R026B (A × 4)

核酸制备·纯化

PCR用模板样品的制备

提取组织、细胞、细菌、酵母、植物等的基因组DNA，制备模板DNA。

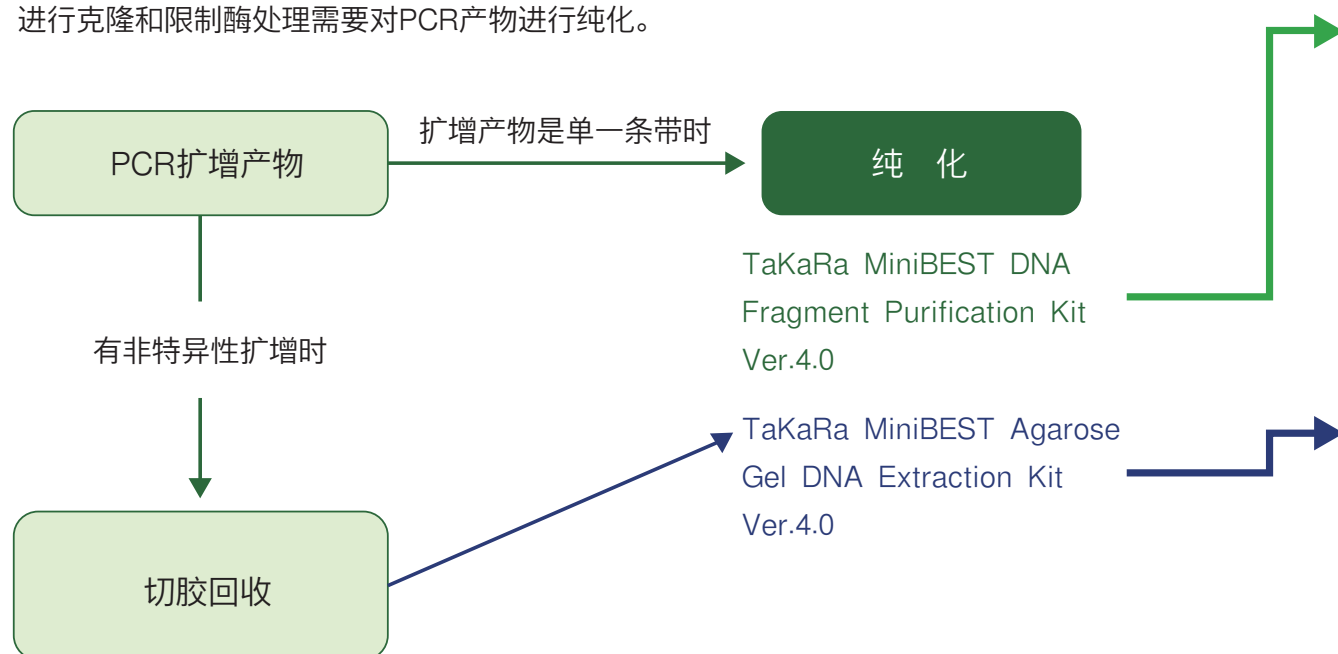


※ QUICK-Clone cDNA是指

通过使用基因特异性引物能够进行目的基因PCR扩增的双链cDNA。QUICK-Clone cDNA是以高品质的Premium Poly A⁺ RNA为原料使用Oligo dT引物合成，去除了残存的RNA和小于400 bp的cDNA片段的双链cDNA，可直接用于PCR反应。详细内容请查阅Takara官网。

PCR扩增片段的纯化

进行克隆和限制酶处理需要对PCR产物进行纯化。



更多核酸制备及纯化产品请查阅Takara官网。

● 模板DNA简易提取试剂

◆ 可用于处理多个检测样本

- 动物组织（小鼠尾）或植物组织、血液、土壤、菌体等起始，可简便制备PCR的模板。
- 只需要添加一种试剂。95℃加热10分钟即可简易提取DNA。

产品名称	包装量	Code No.
MightyPrep reagent for DNA	20 ml	9182

● 提取高收量、高纯度的基因组DNA

◆ 动物组织、培养细胞、血液、革兰氏阴性细菌、植物组织（植物幼嫩的叶、茎、根等）等起始的基因组DNA的有效制备

- 高效、快速、操作方便：不必液氮研磨，也可高效快速提取基因组DNA；提取的DNA完整性好，纯度高，可用于多种分子生物学实验。
- 适用于多种材料的DNA提取，如动植物组织、培养细胞、革兰氏阴性菌、全血。

产品名称	包装量	Code No.
TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0	50 次	9765

◆ 植物来源的高纯度、高收量基因组DNA的纯化

- 操作简单、方便，DNA收量高、纯度好。
- 适用性强，适用于各种植物的各部分组织的DNA提取。

产品名称	包装量	Code No.
TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit	50 次	9768

● PCR反应液纯化

- 回收率高：回收率高达70~95%。
- 高效、快速、操作方便：全套操作只需15分钟便可完成。
- 纯度高：可除去酶蛋白、DNA引物（小于65 mers 的引物都可以除去）、dNTP等。
- 吸附核酸量大：每次可纯化多至20 μg的DNA片段。
- 纯化核酸范围大：50 bp~20 kb。



产品名称	包装量	Code No.
TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0	50 次	9761

● 切胶回收

- 高效、快速、操作方便：溶胶能力很强，无需加热，在室温(15~25℃)条件下即可快速溶解凝胶，全套操作只需20分钟便可完成。
- 含有pH指示剂：含有色彩鲜明的黄色pH指示剂，方便判断溶液的pH值是否适合与DNA制备膜结合。
- 回收核酸范围大：50 bp~20 kb。

产品名称	包装量	Code No.
TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0	50 次	9762

表达系统的选择

(蛋白质表达系统概览)

包含多种原理和结构不同的蛋白质表达系统，请根据目的蛋白质选择表达系统

▶ 短芽孢杆菌表达系统

p.7

分泌表达、大量表达、活性蛋白质表达

▶ 大肠杆菌cold shock表达系统

p.8

可溶性表达、高效率、高纯度

推荐

▶ 人细胞表达载体

p.9

与常规方法相比表达量高约10倍的表达载体 (HEK293细胞系)

▶ 无细胞蛋白质合成系统 (人细胞来源)

p.9

1个反应管&1步反应，高分子合成

▶ 植物转化用高表达载体

p.10

包含双子叶植物、单子叶植物用高表达产品

1 短芽孢杆菌表达系统【*Brevibacillus* Expression System】

- 分泌表达活性蛋白质
能够有效表达各种生物来源的酶和细胞因子，且已确认产物具有生物活性。
- 有效防止蛋白酶的分解作用
由于宿主菌的蛋白酶基因被敲除，目的蛋白质能够不被降解直接分泌到培养基上清中。
- 培养、操作简单
宿主菌很容易在一般的培养基中培养。由于菌体中的孢子基因被破坏，使用后很容易灭菌。

产品名称	概要	His-Tag	标签切断	包装量	Code No.
<i>Brevibacillus</i> Expression System II	分泌表达系统: pNY326载体、pNCMO2载体、感受态细胞套装	-	-	1 Kit	HB200
pNY326 DNA	在短芽孢杆菌内复制的质粒	-	-	10 μg	HB111
pNCMO2 DNA	可以在短芽孢杆菌与大肠杆菌之间穿梭的质粒	-	-	10 μg	HB112
pNY326-BLA DNA	对照载体	-	-	1 μg	HB114
pNC-HisT DNA	短芽孢杆菌与大肠杆菌的穿梭质粒能够分泌表达 his-tag融合蛋白质	●	TB	10 μg	HB121
pNC-HisF DNA		●	FXa	10 μg	HB122
pNC-HisE DNA		●	EK	10 μg	HB123
<i>Brevibacillus</i> Competent Cells	<i>B. choshinensis</i> SP3菌株的感受态细胞	/		100 μg	HB116
pNI DNA	短芽孢杆菌细胞内表达载体	-	-	10 μg	HB131
pNI-His DNA		●	EK	10 μg	HB132
BIC System	采用BIC法 (<i>Brevibacillus In vivo Cloning</i> 法) 的高效分泌表达系统。产品包括4种载体 (pBIC DNA Set)、control insert, 感受态细胞	●	EK	1 Kit	HB300
pBIC DNA Set	产品含分泌信号不同的4种载体, 能进行分泌信号的优化, 提高表达成功率, 增加产量。	●	EK	1 Set	HB310

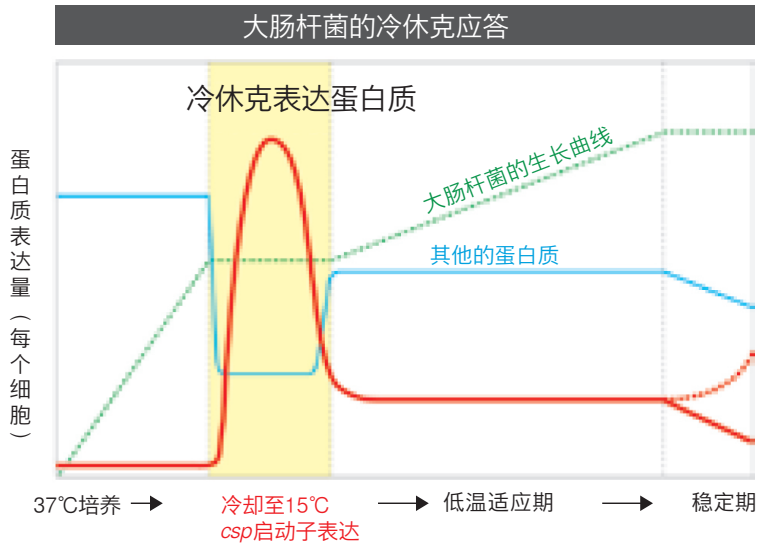
TB: Thrombin、FXa: Factor Xa、EK: Enterokinase

※短芽孢杆菌表达系统相关产品是Higeta公司的产品。

2 大肠杆菌Cold Shock表达系统【pCold™载体系列】

Cold Shock 表达系统是指

将37°C培养的大肠杆菌的培养温度调整到较低时，大肠杆菌将暂停生长，多数蛋白质的表达会降低，而被称为冷休克蛋白（CSPs）的表达会特异性增加。基于这个作用机制，Takara Bio公司与井上正顺教授（University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA）共同研究开发了冷休克蛋白质表达载体——pCold系列。与以往的大肠杆菌表达系统相比，能够高效获得高纯度的目的蛋白质。



冷休克系统具有以下优点：

- 仅需将培养液冷却至15°C即可高效诱导表达
- 同以往的大肠杆菌表达系统相比，可提高生产效率和可溶性表达
- 可以使用广泛的大肠杆菌作为宿主
- 可根据使用目的选择可溶性标签的种类及有无His-tag

冷休克表达的标准操作

在pCold载体的多克隆位点处插入目的基因制备表达载体
 ↓
 表达载体转化大肠杆菌，在含有Amp的LB培养基上筛选转化子
 ↓
 挑取阳性克隆植入含有50–100 μg/ml 氨苄青霉素的LB培养基中，37°C振荡培养。
 ↓
 当培养液OD₆₀₀达到0.4–0.5时，及时将培养液冷却至15°C，放置30分钟。
 ↓
 加入终浓度0.1–1.0 mM的IPTG，15°C振荡培养24小时。
 ↓
 集菌

注：不同目的蛋白质的最适培养、诱导条件（培养基、培养温度、通气搅拌条件、诱导的时机、诱导物的浓度、诱导后的培养时间）不同，请依实验需要研讨实验条件。

产品名称	可溶性标签	His 标签	切断标签	翻译促进序列 (TEE)	包装量	Code No.
pCold™ GST DNA	GST	●	Factor Xa (※1)、HRV 3C Protease (※2)	●	25 μg	3372
pCold™ ProS2 DNA	ProS2 (Protein S)	●	HRV 3C Protease (※2)、Thrombin (※2)、Factor Xa (※2)	●	25 μg	3371
pCold™ TF DNA	TF (Trigger Factor)	●	HRV 3C Protease (※2)、Thrombin (※2)、Factor Xa (※2)	●	25 μg	3365
pCold™ I DNA	–	●	Factor Xa (※1)	●	25 μg	3361
pCold™ II DNA	–	●	–	●	25 μg	3362
pCold™ III DNA	–	–	–	●	25 μg	3363
pCold™ IV DNA	–	–	–	–	25 μg	3364
pCold™ Vector Set					※3	3360

※1: 去除His-Tag序列 ※2: 去除His-Tag及可溶性标签序列 ※3: pCold™ I~IV DNA 各5 μg

推荐 关联产品

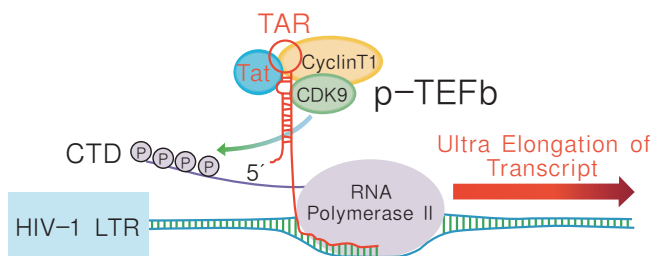
- TaKaRa Competent Cells BL21 (Code No. 9126) . . . 表达用宿主推荐
- Single Protein Production System (SPP System) (Code No. 3366~3370) . . . 同位素标记方便，标记的目的蛋白质最多可达到新生蛋白质的90%。

表达系统的选择

3 人细胞（HEK293细胞系）表达载体【pHEK293 Ultra Expression Vector】

- HEK293 细胞系的瞬时高表达载体。
- 与以往使用CMV启动子的蛋白质表达载体相比，最高可产生10倍量的蛋白质。
- 2种类型产品可供选择
 - 期望简便、高表达，推荐使用Vector I
 - 期望更高表达时，推荐使用能够优化质粒混合比例的Vector II。
- 尤其适用于抗体药物及生物药物在开发阶段的筛选工作。

高表达原理



本系统使用HIV-1病毒来源的RNA序列【TAR】和反转录活性因子【Tat】来实现高表达（TAR-Tat表达系统）。Tat是一种RNA结合蛋白质，它通过与HIV RNA 5'末端茎环状的转录激活反应元件（TAR）相结合，进而激活HIV-1的转录，所以Tat和TAR的结合能够促进转录延伸。

本产品利用该原理，在目的蛋白质表达用载体与Tat表达用载体的5'非翻译区添加编码TAR的序列。使Tat蛋白质有效表达，从而大幅提高目的蛋白质的表达量。

	产品名称	产品内容	包装量	Code No.
操作简便，表达量高	pHEK293 Ultra Expression Vector I	· pHEK293 Ultra Expression Vector I	20 μg	3390
可通过优化载体比例实现更高水平的表达	pHEK293 Ultra Expression Vector II	· pHEK293 Ultra Expression Vector II · pHEK293 Enhancer Vector	各20 μg	3392

4 无细胞蛋白质合成系统 【Human Cell-Free Protein Expression System】

- 利用人源细胞提取物的无细胞蛋白质合成系统。
- 利用IRES序列、通过翻译增强因子的作用提高合成水平。
- 采用简便的单管反应。
- 可用于大于150 kDa的高分子蛋白质的合成。
- 若使用透析型的Maxi System，可进一步提高合成量。

产品名称	概要	精制标签	切断标签	包装量	Code No.
Human Cell-Free Protein Expression System	包含有pT7-IRES 载体、T7 RNA Polymerase、Cell Lysate、Mixture1,2,3的试剂盒	-	-	10 次	3281
Human Cell-Free Protein Expression Maxi System	透析同时进行蛋白质合成，提高合成量	-	-	5 次	3285
pT7-IRES His-N DNA	目的蛋白质与tag融合表达的载体	His	Factor Xa	20 μg	3290
pT7-IRES His-C DNA		His		20 μg	3291
pT7-IRES Myc-N DNA		Myc		20 μg	3292

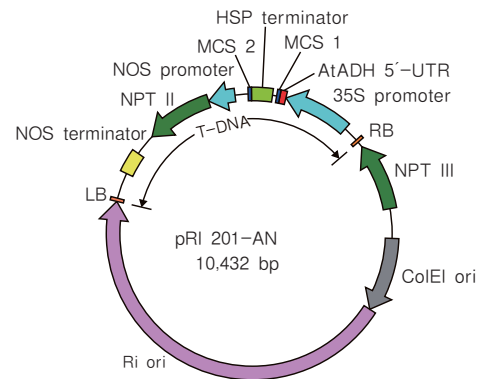
5 植物转化用高表达载体（改良版）【pRI 201 DNA系列】

- 含有Ri质粒的突变型复制起点（Ri ori）的双元载体
- 含有高拷贝的大肠杆菌ori，容易在大肠杆菌中复制
- 含有花椰菜花叶病毒（CaMV）35S启动子
- 采用ADH（Alcohol Dehydrogenase）基因来源的5'非翻译区（5'-UTR）（该区域具有翻译增强子的作用）实现了植物体内目的基因产物的高表达。
- 通过使用HSP（Heat Shock Protein）基因来源的terminator,可以使目的基因获得更高效的表达。

◆ 参考文献 ◆

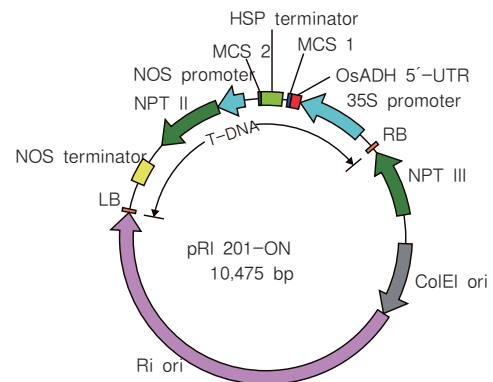
pRI 201-AN与*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 MP90 组合用于*Nicotiana benthamiana* 叶的蛋白质表达

Kimura S, *et al.*, The CBL-interacting protein kinase CIPK26 is a novel interactor of Arabidopsis NADPH oxidase AtRbohF that negatively modulates its ROS-producing activity in a heterologous expression system. *J Biochem*, (2013) 153: 191-195.



pRI 201-AN与*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 组合用于拟南芥的转化

Negishi T, *et al.*, Tonoplast- and Plasma Membrane-Localized Aquaporin-Family Transporters in Blue Hydrangea Sepals of Aluminum Hyperaccumulating Plant. *PLoS One*, (2012) 7 (8) : e43189.



产品名称	概要	包装量	Code No.
pRI 201-AN DNA	AN用于双子叶植物，ON用于单子叶植物，通过使用HSP terminator，与以往的pRI 101系列相比，能实现植物体内目的基因更高的表达。	10 μg	3264
pRI 201-ON DNA		10 μg	3265
pRI 201-AN-GUS DNA	转化时作为阳性对照被广泛使用，是将GUS基因（β-glucuronidase）插入到pRI 201-AN及pRI 201-ON的载体。	10 μg	3266
pRI 201-ON-GUS DNA		10 μg	3267

推荐
关联产品

植物转化用感受态细胞
Agrobacterium tumefaciens LBA4404 Electro-Cells (Code No. 9115)

克隆

首先，请选择合适的克隆方法

	In-Fusion克隆	TA克隆	酶切连接
成功率高的克隆	◎		
多个片段一次克隆	◎		
定向克隆	◎		◎
无酶切位点或者位点不合适	◎		
插入到任意载体的任意位置处	◎		
不需要限制酶的克隆	◎	◎	
缩短克隆时间	◎		
插入长链片段			◎
注重成本		◎	◎

然后，检查选择克隆方法的详细操作

★ 选择In-Fusion克隆 → 请参见p.13-14

★ 进行限制酶/连接、TA克隆 ↴

实验目的	推荐产品
限制酶/连接	
快速·高效率连接	→ DNA Ligation Kit <Mighty Mix> A
平滑末端的连接	→ Blunting Kination Ligation (BKL) Kit B
长链 (>10 kb) 的连接	→ TaKaRa DNA Ligation Kit LONG C
TA克隆	
插入片段的3'末端含有dA	→ Mighty TA-cloning Kit D
插入片段是平滑末端需要添加dA	→ Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR E

限制酶



请登录Takara官网首页，使用Takara限制酶识别序列检索工具



连接

向目的载体中插入目的基因是基因工程实验的基础。

A DNA Ligation Kit <Mighty Mix>

1种反应液，操作简单

反复冻融后性能不受影响

适用于平滑末端和TA克隆

可在5分钟内完成连接反应

B Blunting Kination Ligation (BKL) Kit

短时间内简便的克隆

PCR产物不需要做酶失活、未反应的dNTP及引物的去除处理。

C TaKaRa DNA Ligation Kit LONG

尤其适用于10 kb以上的长链片段的连接

也可用于BAC文库等长链DNA文库的制备



产品名称	包装量	Code No.
DNA Ligation Kit <Mighty Mix>	1 Kit	6023
Blunting Kination Ligation (BKL) Kit	24 次	6127A
TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	1 Kit	6024

TA克隆

使用 *Taq* DNA聚合酶为基础的PCR酶，通常在得到的扩增产物的3'末端会附有一个“A”碱基。

TA克隆，利用3'末端含有“T”碱基的T载体，与PCR产物的dA碱基突出部分互补进行简便的克隆。

(插入片段 5'末端不需要磷酸化。)

D Mighty TA-cloning Kit

短时间的简便克隆

E Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®

PrimeSTAR系列的 α 型DNA聚合酶，由于酶自身含有很强的3'-5'外切酶活性，使用该系列酶得到的PCR产物多数都是平滑末端，不能直接用于TA克隆。PrimeSTAR系列酶得到的扩增产物如果想用于TA克隆需要在产物的3'末端添加“A”碱基。

本产品包含在PrimeSTAR系列酶扩增产物的3'末端简便的添加“A”碱基的试剂，由于同时包含Mighty TA-cloning Kit,也可以作为PrimeSTAR系列酶扩增产物专用的TA克隆试剂。

★ PrimeSTAR系列的基本的特点请见p.3。

产品名称	包装量	Code No.
Mighty TA-cloning Kit	20 次	6028
Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR®	20 次	6019

克隆

In-Fusion 克隆

通过DNA片段末端带有15 bp的同源序列进行克隆的方法。

由于可以利用任意载体的末端序列进行克隆，该方法适用于所有载体，不需要添加多余的序列，且可以进行定向克隆，是一种十分方便的技术。

进行PCR克隆时，不需要使用限制酶。

- ✓ 任意载体的任意位置都可以进行定向克隆。
- ✓ 短片段和长片段（50 bp–15 kb）都可以高效克隆。
- ✓ 可一次性插入多个DNA片段进行多片段克隆。
- ✓ 15分钟即可完成In-Fusion反应。

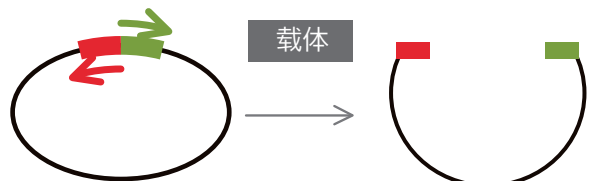
In-Fusion 克隆概要

只要在目的基因的各末端含有与想要插入位置两侧相同的15个碱基即可。



如果使用PCR制备载体和目的基因，可简便的制备直接用于In-Fusion反应的线性的载体和目的基因。

① 准备线性化载体和目的基因



在载体上想要插入片段的位置进行反向PCR

线性的载体准备完成

② 在5 x In-Fusion HD Enzyme Premix & dH₂O

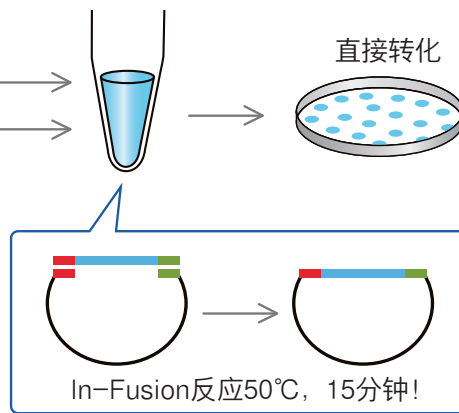
中加入载体和目的基因进行In-Fusion克隆。



对目的基因进行PCR扩增。

目的基因准备完成

引物5'端添加与载体末端同源的15 bp序列。



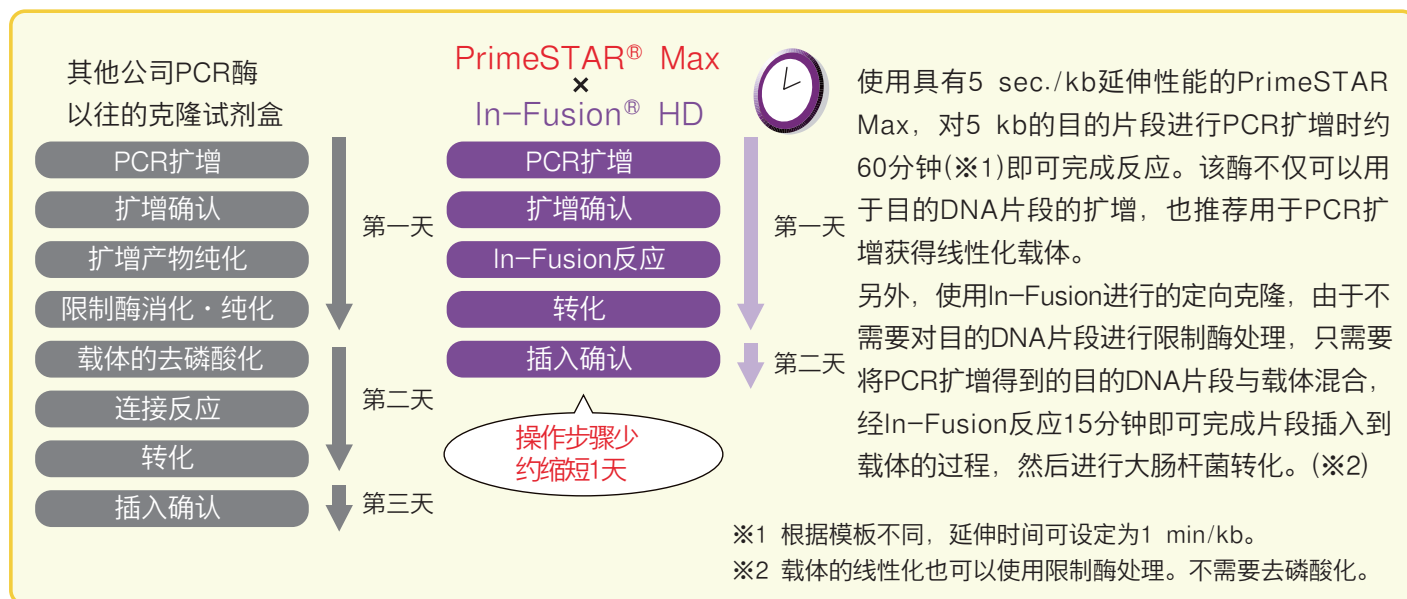
使用PCR进行In-Fusion克隆时，不需要使用限制酶或连接试剂盒。因此In-Fusion克隆简单·便利！



In-Fusion反应的引物设计，可以使用网页免费版设计工具。
<http://www.takarabiomed.com.cn>

In-Fusion的实验例及使用例请见卷末特集（25、26页）的介绍。

◆ 以PCR为基础的In-Fusion克隆实验所需的时间缩短1天。



◆ 基本款In-Fusion试剂盒, 高性价比的选择

产品名称	Code No.	包装量
In-Fusion [®] HD Cloning Kit	639648	10 Rxns
	639649	50 Rxns
	639650	100 Rxns

◆ 加强版In-Fusion试剂盒, 高效克隆的一站式解决方案

产品名称	Code No.	In-Fusion HD附带产品			
		纯化用试剂	纯化用Column	高效感受态细胞	高保真PCR酶
		Cloning Enhancer	NucleoSpin	Stellar [™] Competent Cell	CloneAmp [™] HiFi PCR Premix
In-Fusion [®] HD Cloning Kit	639648/49/50	-	-	-	-
In-Fusion [®] HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer	639633/34/35	✓	-	-	-
In-Fusion [®] HD Cloning Kit w/NucleoSpin	639639/40/41	-	✓	-	-
In-Fusion [®] HD Cloning Kit w/Competent Cells	639642/43/44	-	-	✓	-
In-Fusion [®] HD Cloning Plus	638909/10/11/20	-	✓	✓	✓
In-Fusion [®] HD Cloning Plus CE	638916/17/18/19	✓	-	✓	✓
In-Fusion [®] HD Cloning System	639645/46/47/92	-	✓	✓	-
In-Fusion [®] HD Cloning System CE	639636/37/38/93	✓	-	✓	-

* In-Fusion[®] HD EcoDry[™] Cloning Kit是一种冻干型(可在室温、干燥器内保存)的In-Fusion HD试剂盒。已分装于microtube中, 可立即使用。还有24次量型(8联管×3)和96次量型(96孔板)。

Cloning Enhancer

PCR产物为单一条带时将扩增产物直接用于In-Fusion反应时的前处理试剂。通过前处理, 能够使In-Fusion不受PCR反应使用的引物、模板及dNTP的影响, 而发挥最大的效果。

CloneAmp[™] HiFi PCR Premix

准确性非常高的PCR酶。尤其适用于In-Fusion克隆用插入片段的PCR。本品在In-Fusion HD Cloning Plus系列产品中附带。

Stellar[™] Competent Cells

具有很高的转化能力的感受态细胞。对于长链DNA的转化也可以得到很高的效率, 相比于含有同样基因型的感受态细胞形成菌落的速度更快。pUC系列质粒转化时, 可以利用β-半乳糖苷酶的α-互补性, 通过添加X-Gal对重组体进行蓝白筛选。

NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up

PCR产物为多条带时进行凝胶纯化的Spin-Column。

转化

高转化效率! *E.coli* HST08 Premium Competent Cells

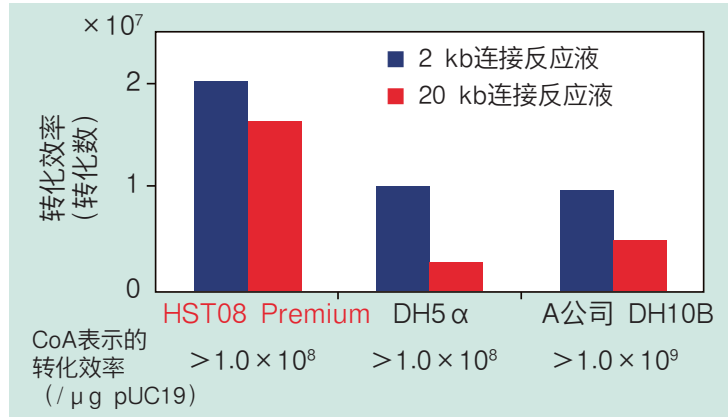
感受态细胞的选择也是克隆能否成功的重要因素之一。使用常规克隆制备不同长度基因cDNA文库时或进行In-Fusion反应时, 为提高成功率推荐使用【HST08】。

- 不仅适用于常规克隆, 也适用于长链DNA (10 kb以上) 的克隆!
- 可用于甲基化DNA的克隆。
- 推荐用于cDNA文库及基因组文库的制备。

● 使用连接反应液进行转化的比较

分别使用DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Code No. 6023) 以及TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (Code No. 6024) 进行 2 kb、20 kb的DNA片段与pUC118 *Hind* III/ BAP (Code No. 3324) 的连接。将上述连接反应液分别转化各感受态细胞、涂布在含有氨苄抗性的LB(+X-Gal)培养基上, 通过得到的白色克隆的数量比较转化效率。

无论转化2 kb还是20 kb的连接液, HST08的转化效率都是最高的, 尤其是20 kb片段的克隆, 可以看到明显的差距。



(数据来源于Takara Bio Inc.比较结果)

产品名称	包装量	Code No.
<i>E. coli</i> HST08 Premium Competent Cells	1 Set (100 μl × 10)	9128
<i>E. coli</i> JM109 Competent Cells	1 Set (100 μl × 10)	9052
<i>E. coli</i> DH5 α Competent Cells	1 Set (100 μl × 10)	9057

插入片段确认

简单方便! 可直接进行电泳

本系列产品是PCR反应的DNA Polymerase、Buffer、dNTP Mixture的2倍浓度的混合物。使用时只需在制品溶液中加入模板和引物便可以进行PCR反应, 大大简化了操作过程, 减少了PCR操作过程中的污染。本系列制品中已含有电泳时所必需的色素试剂 (蓝色和黄色色素), PCR反应后可以直接进行电泳。反应液为鲜艳的绿色 (Emerald Green), 电泳时指示效果明显, 容易观察样品的电泳位置。本系列制品扩增性能强, 保存稳定性好。

使用本系列制品扩增得到的PCR产物的3'端附有一个“A”碱基, 因此可直接克隆于T-Vector中。

Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye)

- 以 λ DNA 为模板，可以很好地扩增 8 kb 的 DNA 片段
- 以人基因组 DNA 为模板，可以很好地扩增 3 kb (p53 基因) 的 DNA 片段。

Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0 plus dye)

- 以 λ DNA 为模板，可以很好地扩增 20 kb 的 DNA 片段
- 以人基因组 DNA 为模板，可以很好地扩增 3 kb (p53 基因) 的 DNA 片段。

Premix Taq™ (LA Taq™ Version 2.0 plus dye)

- 以 λ DNA 为模板，可以很好地扩增 28 kb 的 DNA 片段
- 以人基因组 DNA 为模板，可以很好地扩增 17.5 kb (β-Globin gene) 的 DNA 片段。



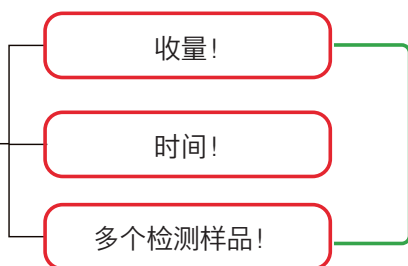
产品名称	包装量	Code No.
<i>Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye)</i>	50 μl 反应 × 40 次/120 次	RR901Q/A
<i>Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0 plus dye)</i>	50 μl 反应 × 40 次/120 次	RR902Q/A
<i>Premix Taq™ (LA Taq™ Version 2.0 plus dye)</i>	50 μl 反应 × 20 次/60 次	RR903Q/A

质粒纯化

目的是?

重视哪方面?

Mini prep想用于
• Cloning
• Transformation
• Sequencing



TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0

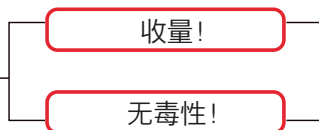
产品名称	包装量	Code No.
TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.4.0	50 次	9760

本试剂盒全套操作只需1小时便可完成。可以1~4 ml LB培养基过夜培养的菌液中纯化得到1~20 μg的高纯度质粒DNA。

目的是?

重视哪方面?

想用于Transfection
(Endotoxin free)



TaKaRa MidiBEST Endo-free Plasmid Purification Kit

产品名称	包装量	Code No.
TaKaRa MidiBEST Endo-free Plasmid Purification Kit	25 次	9783
	10 次	9783S

使用本试剂盒可从100 ml LB培养基过夜培养菌液中纯化得到200 μg的高纯度无内毒素质粒DNA (内毒素含量 <0.1 EU/μg)。

蛋白质纯化

以下介绍纯化His-tag融合蛋白质的制品和使用Protein A进行抗体纯化的制品。

Takara Bio不仅销售高质量的His-tag融合蛋白质纯化用TALON®树脂和快速、简单的Capturem™ Spin Column，同时也销售抗体纯化用的Capturem™ Spin Column。请依据您的实验目的进行选择。

◆ His-tag融合蛋白质纯化用

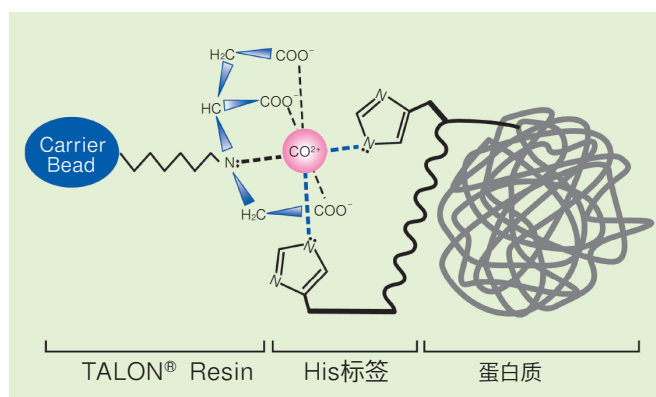
	特点	收量	所需时间	简便度
TALON® 系列树脂 → p.17-18	丰富的产品线，纯度高、收量高	20 mg protein / ml resin	60~120 min	★★★★
Capturem™ His-Tagged → p.19-20	操作简单且短时间内即可完成His标签蛋白质纯化	0.1 mg protein / mini column 2.5 mg protein / maxi column 0.1 mg protein / well (96 well) 25 mg protein / unit 0.8 mg protein / well (24 well)	5~30 min	★★★★★

◆ 抗体纯化用

	特点	收量	所需时间	简便度
Capturem™ Protein A → p.21-22	操作简单且短时间内即可完成抗体纯化	0.3 mg protein / mini column 2.5 mg protein / maxi column 0.3 mg protein / well (96 well) 0.4 mg protein / well (24 well)	5~15 min	★★★★★
Capturem™ Protein G → p.21-22	操作简单且短时间内即可完成抗体纯化	0.05-0.1 mg protein / mini column 1.0-2.0 mg protein / maxi column 0.05-0.1 mg protein / well (96 well) ~0.6 mg protein / well (24 well)	5~15 min	★★★★★

TALON® Resin 高纯度His标签蛋白质纯化

- 利用对组氨酸重复序列高度特异的 Co^{2+} 的特性，降低非特异性吸附从而实现高纯度纯化
- 4个配位团能够将 Co^{2+} 稳定螯合，很少有金属离子的脱落。
- 兼容多种纯化条件，在使用6M盐酸胍的变性条件下也能够高效纯化。



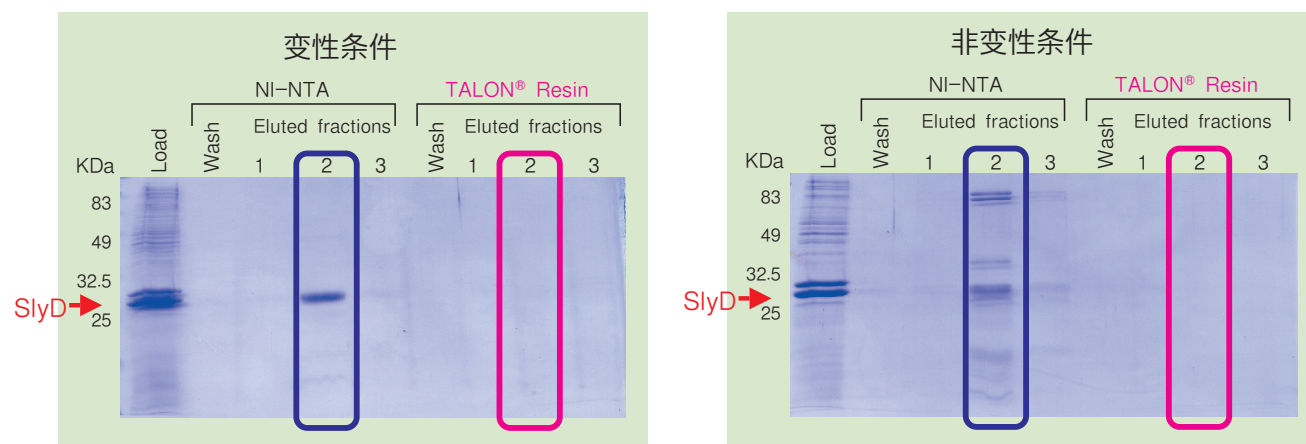
TALON®树脂的基本结构与分子机制

传统的 Ni^{2+} 树脂对蛋白质空间构象要求不严格，除了与组氨酸标签结合以外，还可能与色氨酸、半胱氨酸的残基相结合。而TALON®树脂的活性中心呈“三维口袋”结构，对组氨酸标签有很强的亲和特异性和选择性，此外，4个配位基团螯合固定 Co^{2+} 提高了稳定性，几乎很少会发生由于金属离子脱落导致的目的蛋白质的损失。

◆ TALON® Resin的吸附特异性

在使用Ni²⁺螯合树脂时，常会出现非特异吸附不含组氨酸标签蛋白质的情况，而TALON® Resin很少会吸附组氨酸标签融合蛋白质以外的其他蛋白质。

- 比较Ni-NTA树脂和TALON®树脂对BL21 (DE3) pLysS细菌株来源的SlyD蛋白质 (27 kDa) 的结合能力 (SlyD: 含有2价金属离子结合部位的脯氨酰异构酶)



由上图可见，Ni-NTA Resin能够非特异性吸附SlyD，因而导致非目的蛋白质的混入。

TALON® Resin无论是变性条件还是非变性条件都没有非特异性吸附。因此没有非目的蛋白质混入，从而能够进行高纯度的纯化。

产品名称	包装量	Code No.	瓶装树脂	预装柱	Buffer	
					提取缓冲液	纯化缓冲液
● His标签蛋白质纯化用树脂—重力流						
TALON® Metal Affinity Resin	10 ml	635501	●			
	25 ml	635502	●			
TALON® 2 ml Disposable Gravity Column	50 Columns	635606		●空柱		
● His标签蛋白质纯化用树脂—FPLC						
TALON® Superflow Metal Affinity Resin	25 ml	635506	●			
● 预包装型FPLC纯化柱及纯化Buffer						
HisTALON™ Superflow Cartridges	1 ml × 5	635650		●		
	5 ml × 1	635683		●		
HisTALON™ Buffer Set	20 次	635651			●	●
● 预包装型重力流纯化柱						
HisTALON™ Gravity Column Purification Kit	1 Kit	635654		●	●	●
HisTALON™ Gravity Columns	1 ml × 5	635655		●		
● 磁珠型填料						
TALON® Magnetic Beads	1 ml × 2	635636	●磁珠			
TALON® Magnetic Beads Buffer Kit	1 Kit	635638			●	●
● 预装树脂的Spin Column型—用于小量样品简便操作						
TALON® Spin Columns	0.5 ml × 10	635601		●		
● 细菌及细胞样品提取蛋白质的专用buffer						
xTractor™ Buffer Kit	1 Set	635623			●	
xTractor™ Buffer	100 ml	635656			●	

※以上产品还有多种不同规格，详情请查询官网www.takarabiomed.com.cn

蛋白质纯化

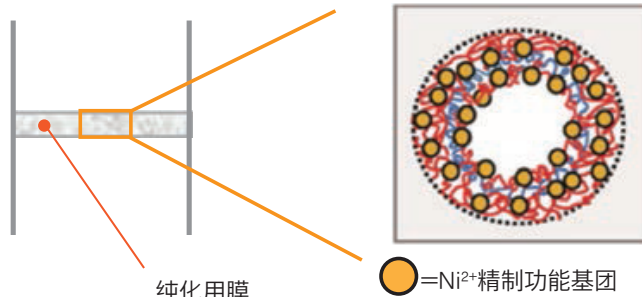
Capturem™ His-Tagged Purification 仅需要5~30分钟即可完成His标签蛋白质的纯化

- 短时且简便的操作，即可实现高纯度纯化
使用从培养液中制备的澄清裂解液上柱，操作时间短，可以防止蛋白质品质下降，还可以实现高收率、高纯度的纯化。
- 在室温下操作，适用于哺乳动物细胞样品及细菌样品
纯化柱中使用新型的尼龙膜，可以实现室温下的迅速操作。
- 在多种添加剂存在的情况下，也可发挥一贯的高性能
在buffer中存在变性剂（8 M尿素、6 M盐酸胍）及添加剂（ β -ME、EDTA、DTT、甘油、TCEP）等宽广范围条件下，仍然可以表现出一贯的高性能。
- 柱床体积小，可实现高浓度溶出

新型膜技术

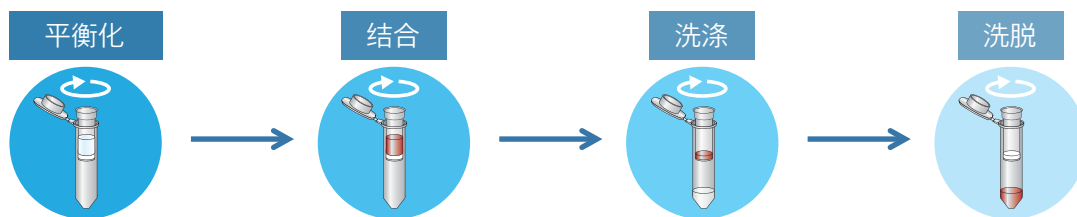
更大的膜表面积，可实现大容量纯化。

与纯化时间长的树脂柱相比，新技术的高容量膜细孔可以实现快速滴落，使短时精制成为可能。可在低压下滴落，所以不会引起蛋白质品质降低。另外，柱床体积较小，可进行无Wash buffer残留的高纯度纯化。



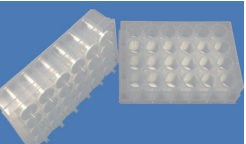

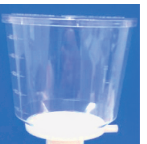


Capturem™ His-Tagged Purification 基本流程

样品：使用裂解buffer从培养液中制备澄清的裂解液，Mini、24孔板和96孔板产品可直接上柱，Maxi产品需先通过Maxiprep Filter后再上柱，Large Volume产品需要结合使用真空抽滤设备。

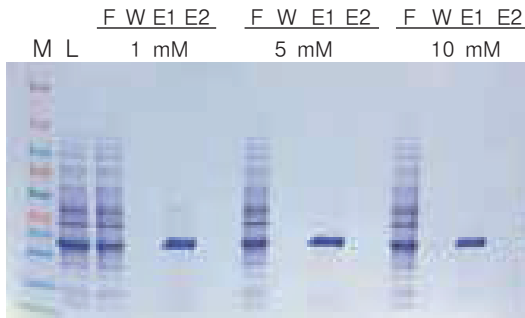


精制时间：Mini产品**5分钟**，Maxi、24 well及96 well plate产品**15分钟**以内，Large Volume产品**15-30分钟**。

	Miniprep Kit	Maxiprep Kit	24 well plate	96 well plate	Large Volume
	 Mini Spin Column	 Maxiprep Nickel Column	 24 Well Plate	 96 Nickel Plate	 Large Volume Unit
最大上样量	~800 μ l	~25 ml	~4.5 ml	~1,000 μ l	150~500 ml
包装量	20 Rxns	6 Purifications	24 Well	96 well	4 Purifications
所需时间	5 分	15 分	15 分	15 分	15~30 分
溶出浓度	0.3~1 mg protein/ml	1.6~4.5 mg protein/ml	0.8 mg protein/ml	0.3~1 mg protein/ml	最大2.0 mg protein/ml
收量	0.1 mg protein/column	2.5 mg protein/tube	0.8 mg protein/well	0.1 mg protein/well	25 mg protein/unit

◆ 添加剂存在下也可实现高纯度纯化

【例】 Capturem™ His-Tagged Purification Miniprep Kit中添加EDTA的影响研讨



Sample	Amount of Eluate 1
1 mM EDTA	139 µg
5 mM EDTA	112 µg
10 mM EDTA	98 µg

1 mM、5 mM及10 mM的EDTA存在下，对含有6×His标签的融合蛋白质GFPuv进行精制。样品、平衡buffer、清洗buffer和洗脱buffer中分别加入EDTA进行精制操作，并用300 µl的洗脱buffer洗脱2次。

M : Marker L : Lysate F : Flow through W : Wash
E1 : Eluate 1 E2 : Eluate 2

*图片来自于Takara Bio USA, Inc.

★可向buffer中添加的试剂一览表，请参考TBUSA或www.takarabiomed.com.cn网站

◆ 可以在纯化过程中添加的试剂一览

试剂	浓度
MOPS	200 mM
HEPES	200 mM
Tris	200 mM
EDTA	10 mM
β-mercaptoethanol	30 mM
DTT	10 mM
TCEP	5 mM
Guanidine-HCl	6 M
Urea	8 M

试剂	浓度
Nonionic detergent (Triton X-100)	2%
Nonionic detergent (Tween 20)	2%
Anionic detergent (SDS)	1%
Arginine	500 mM
Glycine	100 mM
Histidine	20 mM
Sodium chloride	2 M
Imidazole	40 mM
Glycerol	10%

试剂盒组分

- Capturem His-Tagged Purification Maxiprep Kit
- Capturem Maxiprep Nickel Column 6个
 - Capturem Maxiprep Filters 6个
 - xTractor Buffer 200 ml
 - Wash Buffer 40 ml
 - Elution Buffer 15 ml
- Capturem His-Tagged Purification Miniprep Kit
- Mini Spin Column 20个
 - xTractor Buffer 15 ml×2
 - Wash Buffer 10 ml
 - Elution Buffer 10 ml
- Capturem His-Tagged Purification 96 (★)
- Capturem 96 Nickel Plate 1块
- Capturem His-Tagged Purification Large Volume (★)
- Capturem His-Tagged Purification Large Volume Units 4套
 - 滤瓶螺纹接头 1个
- Capturem His-Tagged Purification Maxiprep Columns (★)
- Capturem Maxiprep Nickel Column 50个
- Capturem™ His-Tagged Purification 24-Well Plate (★)
- Capturem His-Tagged Purification 24-Well Plate 1块

★ Capturem His-Tagged Purification 96 well、24 well、Maxiprep Columns以及Large Volume中不含buffer，请使用以下组分的buffer。

缓冲液	
Lysis Buffer	推荐使用xTractor Buffer (Code No. 635625) 也可使用其他标准的裂解buffer组分
Wash Buffer	150 mM NaCl, 20 mM Na ₃ PO ₄ , pH7.6
Elution Buffer	500 mM NaCl, 20 mM Na ₃ PO ₄ , 500 mM imidazole, pH7.6

保存温度

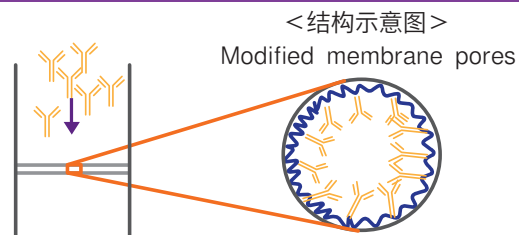
- 柱子、平板和瓶顶装置：室温4℃保存
- Buffer：未开封室温保存，开封后请在4℃保存

制品名称	Code No.	包装量
Capturem™ His-Tagged Purification Miniprep Kit	635710	20 次
Capturem™ His-Tagged Purification Maxiprep Kit	635713	6 次
Capturem™ His-Tagged Purification 96	635714	1 × 96 well plate
Capturem™ His-Tagged Purification Maxiprep Columns	635719	50 次
Capturem™ His-Tagged Purification Large Volume	635724	4 次
Capturem™ His-Tagged Purification 24-Well Plate	635730	1 × 24 well plate

蛋白质纯化

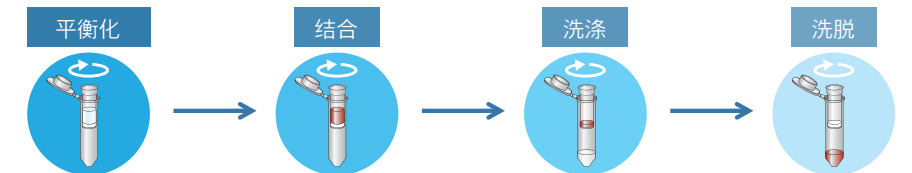
Capturem™ Protein A/Protein G 仅需5~15分钟即可完成抗体的纯化

- 膜表面积大，可实现高容量纯化。
- 与纯化时间长的树脂柱相比，样品通过新型膜技术的高容量细孔滴落速度快、可在短时间内进行纯化。在低压力下也可以滴落，不会引起蛋白质品质下降。
- 柱床体积小，无Wash buffer残留，产物纯度更高。



Capturem™ Protein A/Protein G Miniprep的基本流程

样品：动物血清、腹水、培养液等，可取上清直接添加到柱子当中。



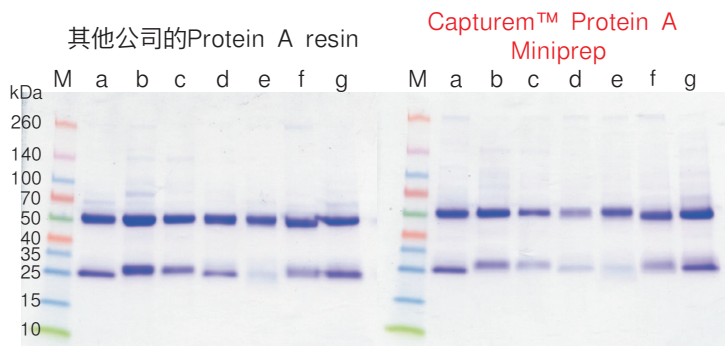
纯化时间：Miniprep产品 5分钟，Maxiprep、24 well和96 well plate 产品15分钟

	Capturem™ Protein A Miniprep	Capturem™ Protein A Maxiprep	Capturem™ Protein A 24-Well	Capturem™ Protein A 96
包装形式	Miniprep Column	Maxiprep Column	24 Well Plate	96 Well Plate
上样量	200~800 μ l	2~20 ml	0.5~4.5 ml	200~1,000 μ l
操作时长	5 分	15 分	15 分	15 分
收量	0.3 mg protein/column	2.5 mg protein/column	0.4 mg/well	0.3 mg protein/column
溶出浓度	1~3 mg protein/ml	0.6~1.6 mg protein/ml	0.3~0.8 mg protein/ml	1~3 mg protein/ml
离心条件	1,000 \times g 1 min (注)	2,000 \times g 3 min (注)	6,00 \times g 2 min (注)	2,000 \times g 3 min (注)

* : Capturem™ protein G系列产品的相关参数，请到网站www.takarabiomed.com.cn查找。

注：Miniprep产品需要使用2 ml tube用的离心机，Maxiprep产品需要使用50 ml tube用的离心机，24孔板、96孔板产品需要使用24孔板、96孔板用的离心机或抽吸过滤装置。

- 与其他公司的比较① —收量— 与其他公司产品相比，可实现高收量的抗体纯化。



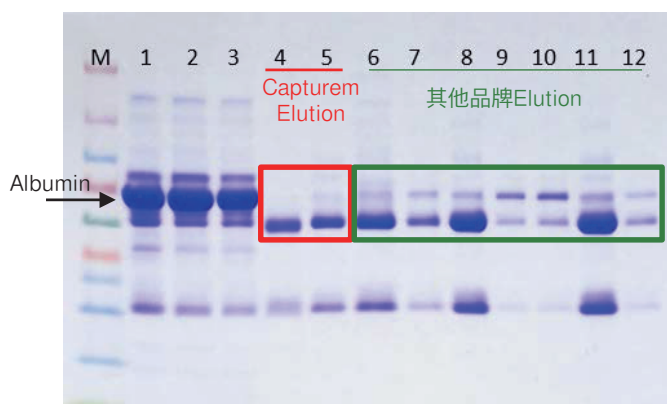
Capturem™ Protein A Miniprep和Protein A resin的比较

Sample	Amount in Elution Samples (μ g)	
	Protein A resin	Capturem™ Protein A Miniprep
a) Mouse	90	122
b) Sheep	94	207
c) Goat	55	104
d) Rat	42	191
e) Rabbit	70	94
f) Horse	80	251
g) Human	114	180

(数据来源于Takara Bio USA, Inc.)

从各种动物血清当中纯化抗体，使用Capturem™ Protein A Miniprep及其他公司的Protein A resin进行比较。纯化后的抗体，进行SDS-PAGE电泳，之后使用考马斯亮蓝染色（左图）。在280 nm处进行吸光度测定，确定抗体的收量（右表）。Capturem™ Protein A Miniprep与其他公司的Protein A resin相比，纯化抗体收量更高。

●与其他公司的比较② —纯度— 与其他公司产品相比，可实现高纯度的抗体纯化。



Capturem™ Protein A (红色框) 相比于其他公司Protein A resin (绿色框)，可获得更高纯度的抗体。

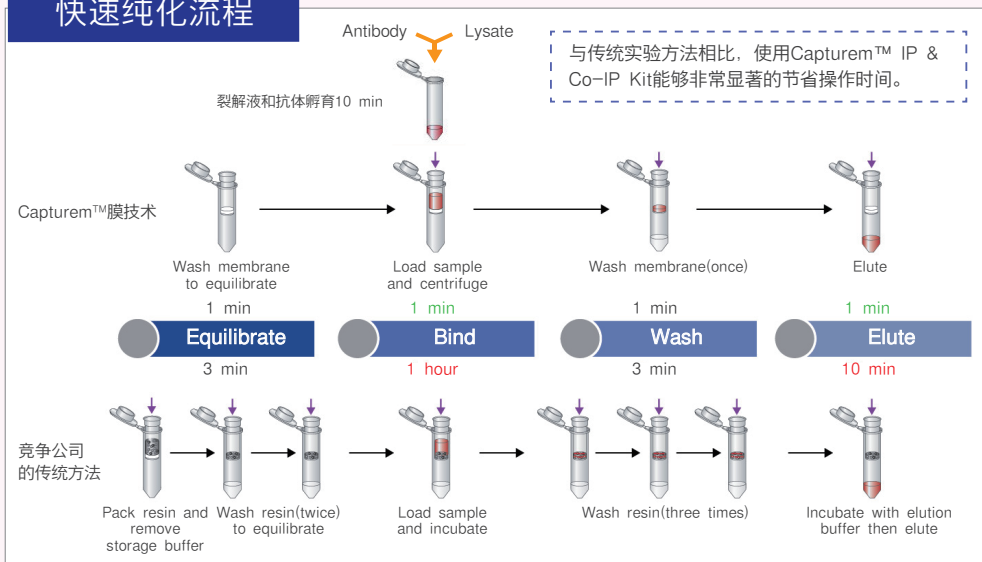
纯化人血清来源的抗体，使用Capturem™ Protein A与其他公司的Protein A resin进行比较，血清中的白蛋白被去除了。

- | | | |
|-----------------------------|---------|--------------------|
| 1. Human Serum | 6. A品牌 | Elution 1 |
| 2. B品牌洗涤液 | 7. A品牌 | Elution 2 |
| 3. C品牌洗涤液 | 8. B品牌 | Elution 1 |
| 4. Capturem Elution (马血清样品) | 9. B品牌 | Elution 2 |
| 5. Capturem Elution | 10. B品牌 | Elution 2 (repeat) |
| | 11. C品牌 | Elution 1 |
| | 12. C品牌 | Elution 2 |

(以上比较结果来源于Takara Bio USA, Inc.)

制品名称	Code No.	包装量
Capturem™ Protein A Miniprep	635717	12 次
Capturem™ Protein A Maxiprep	635720	6 次
Capturem™ Protein A 96	635716	1 × 96 well plate
Capturem™ Protein A 24-Well Plate	635731	1 × 24 well plate
Capturem™ Protein G Miniprep	635725	10 次
Capturem™ Protein G 96	635726	1 × 96 well plate
Capturem™ Protein G Maxiprep	635727	6 次
Capturem™ Protein G 24-Well Plate	635732	1 × 24 well plate

快速纯化流程



蛋白质相互作用研究

——快速IP&Co-IP推荐

Capturem™ IP & Co-IP Kit是基于Protein A原理、应用Capturem™膜技术的快速免疫沉淀产品，为快速提取“抗体-蛋白质”或提取“抗体-蛋白质-蛋白质”复合物提供了完整、易用性的解决方案。

实验操作简单快速，抗体与样品孵育之后在室温下进行的纯化仅需5 min。

制品名称	Code No.	包装量
Capturem™ IP & Co-IP Kit	635721	12 次

[参考] Double Digestion(双酶切反应)时Universal Buffer(通用缓冲液)的使用表

本表以在pUC系列载体的多克隆位点处的各限制酶为核心，显示了Double Digestion可使用的最佳Universal Buffer条件。在本表中，各Universal Buffer之前表示的[数字×]是指各Universal Buffer的反应体系中的最终浓度。Takara销售产品中添附的Universal Buffer全为10倍浓度的缓冲液。终浓度为0.5×时反应体系中的缓冲液则稀释至20倍，1×时稀释至10倍，2×时稀释至5倍进行使用。

	<i>Acc</i> I	<i>Bam</i> H I	<i>Bgl</i> II	<i>Cla</i> I	<i>Eco</i> R I	<i>Eco</i> R V	<i>Hinc</i> II	<i>Hind</i> III	<i>Kpn</i> I	<i>Nco</i> I
<i>Acc</i> I	-	0.5× K	1× T	1× M	1× M	0.5× K	1× M	1× M	1× M	1× M +BSA
<i>Bam</i> H I	0.5× K	-	1× K	1× K	1× K	1× K	0.5× K	1× K	0.5× K	1× K +BSA
<i>Bgl</i> II	1× T	1× K	-	1× H	1× H	1× H	2× K	1× K	1× T	1× K +BSA
<i>Cla</i> I	1× M	1× K	1× H	-	1× H	1× H	1× M	1× M	1× M	1× K +BSA
<i>Eco</i> R I	1× M	1× K	1× H	1× H	-	1× H	1× M	1× M	1× M	1× K +BSA
<i>Eco</i> R V	0.5× K	1× K	1× H	1× H	1× H	-	2× T	1× K	0.5× K	1× K +BSA
<i>Hinc</i> II	1× M	0.5× K	2× K	1× M	1× M	2× T	-	1× M	1× M	1× M +BSA
<i>Hind</i> III	1× M	1× K	1× K	1× M	1× M	1× K	1× M	-	1× M	1× K +BSA
<i>Kpn</i> I	1× M	0.5× K	1× T	1× M	1× M	0.5× K	1× M	1× M	-	0.5× K +BSA
<i>Nco</i> I	1× M +BSA	1× K +BSA	1× K +BSA	1× K +BSA	1× K +BSA	1× K +BSA	1× M +BSA	1× K +BSA	0.5× K +BSA	-
<i>Nde</i> I	1× T	1× K	1× H	1× H	1× H	1× H	1× T	1× K	1× T	1× K +BSA
<i>Not</i> I	0.5× K +BSA	0.5× K +BSA	1× H +BSA	1× H +BSA	1× H +BSA	1× H +BSA	0.5× K +BSA	0.5× K +BSA	0.5× K +BSA	0.5× K +BSA
<i>Pst</i> I	1× M	1× K	1× H	1× H	1× H	1× H	1× M	1× M	1× M	1× K +BSA
<i>Pvu</i> I	0.5× K	1× K	1× K	1× K	1× K	1× K	0.5× K	1× K	0.5× K	1× K +BSA
<i>Sac</i> I	1× M	0.5× K	0.5× K	1× M	1× M	0.5× K	1× M	1× M	1× L	0.5× K +BSA
<i>Sal</i> I	1.5× T	1.5× T	1× H	1× H	1× H	1× H	1.5× K	1.5× K	1.5× T +BSA	1.5× T +BSA
<i>Sma</i> I	1× T +BSA	0.5× T +BSA	1× T +BSA	1× T +BSA	1× T +BSA	0.5× K +BSA	1× T +BSA	1× T +BSA	1× T +BSA	1× T +BSA
<i>Spe</i> I	1× M	1× K	1× H	1× M	1× H	1× H	1× M	1× M	1× M	1× K +BSA
<i>Sph</i> I	0.5× K	1× K	1× H	1× H	1× H	1× H	2× T	1× K	0.5× K	1× K +BSA
<i>Xba</i> I	1× M	0.5× K	2× T	1× M	1× M	2× T	1× M	1× M	1× M	1× M +BSA
<i>Xho</i> I	1× M	1× K	1× H	1× H	1× H	1× H	1× M	1× M	1× M	1× K +BSA

注1) 1 μg DNA中添加10 U的限制酶, 在50 μl的反应体系中, 37°C下反应1小时可以完全降解DNA。

注2) 为防止Star活性, 请将反应体系中的甘油含量尽量控制在10%以下。

注3) 根据DNA的种类, 各DNA的高级结构的差别, 或当限制酶识别位点邻接时, 有时会发生Double Digestion不能顺利进行。

<i>Nde</i> I	<i>Not</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Pvu</i> I	<i>Sac</i> I	<i>Sal</i> I	<i>Sma</i> I	<i>Spe</i> I	<i>Sph</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Xho</i> I
1 × T	0.5 × K +BSA	1 × M	0.5 × K	1 × M	1.5 × T	1 × T +BSA	1 × M	0.5 × K	1 × M	1 × M
1 × K	0.5 × K +BSA	1 × K	1 × K	0.5 × K	1.5 × T	0.5 × T +BSA	1 × K	1 × K	0.5 × K	1 × K
1 × H	1 × H +BSA	1 × H	1 × K	0.5 × K	1 × H	1 × T +BSA	1 × H	1 × H	2 × T	1 × H
1 × H	1 × H +BSA	1 × H	1 × K	1 × M	1 × H	1 × T +BSA	1 × M	1 × H	1 × M	1 × H
1 × H	1 × H +BSA	1 × H	1 × K	1 × M	1 × H	1 × T +BSA	1 × H	1 × H	1 × M	1 × H
1 × H	1 × H +BSA	1 × H	1 × K	0.5 × K	1 × H	0.5 × K +BSA	1 × H	1 × H	2 × T	1 × H
1 × T	0.5 × K +BSA	1 × M	0.5 × K	1 × M	1.5 × K	1 × T +BSA	1 × M	2 × T	1 × M	1 × M
1 × K	0.5 × K +BSA	1 × M	1 × K	1 × M	1.5 × K	1 × T +BSA	1 × M	1 × K	1 × M	1 × M
1 × T	0.5 × K +BSA	1 × M	0.5 × K	1 × L	1.5 × T +BSA	1 × T +BSA	1 × M	0.5 × K	1 × M	1 × M
1 × K +BSA	0.5 × K +BSA	1 × K +BSA	1 × K +BSA	0.5 × K +BSA	1.5 × T +BSA	1 × T +BSA	1 × K +BSA	1 × K +BSA	1 × M +BSA	1 × K +BSA
-	1 × H +BSA	1 × H	1 × K	1 × T	1 × H	1 × T +BSA	1 × H	1 × H	1 × T	1 × H
1 × H +BSA	-	1 × H +BSA	2 × K +BSA	0.5 × K +BSA	1 × H +BSA	0.5 × T +BSA	1 × H +BSA	1 × H +BSA	0.5 × K +BSA	1 × H +BSA
1 × H	1 × H +BSA	-	1 × K	1 × M	1 × H	0.5 × T +BSA	1 × H	1 × H	1 × M	1 × H
1 × K	2 × K +BSA	1 × K	-	0.5 × K	1.5 × K +BSA	1 × K +BSA	1 × K	1 × K	0.5 × K	1 × K
1 × T	0.5 × K +BSA	1 × M	0.5 × K	-	1.5 × T +BSA	1 × T +BSA	1 × M	0.5 × K	1 × M	1 × M
1 × H	1 × H +BSA	1 × H	1.5 × K +BSA	1.5 × T +BSA	-	1.5 × T +BSA	1 × H	1 × H	1.5 × T	1 × H
1 × T +BSA	0.5 × T +BSA	0.5 × T +BSA	1 × K +BSA	1 × T +BSA	1.5 × T +BSA	-	1 × T +BSA	0.5 × T +BSA	1 × T +BSA	1 × T +BSA
1 × H	1 × H +BSA	1 × H	1 × K	1 × M	1 × H	1 × T +BSA	-	1 × H	1 × M	1 × H
1 × H	1 × H +BSA	1 × H	1 × K	0.5 × K	1 × H	0.5 × T +BSA	1 × H	-	2 × T	1 × H
1 × T	0.5 × K +BSA	1 × M	0.5 × K	1 × M	1.5 × T	1 × T +BSA	1 × M	2 × T	-	1 × M
1 × H	1 × H +BSA	1 × H	1 × K	1 × M	1 × H	1 × T +BSA	1 × H	1 × H	1 × M	-

众多克隆试剂盒中，Takara Bio强烈推荐In-Fusion试剂盒，其原因有很多方面，介绍如下：

理由-1 多片段克隆相比于其他公司的同类产品效率更高

【实验例】

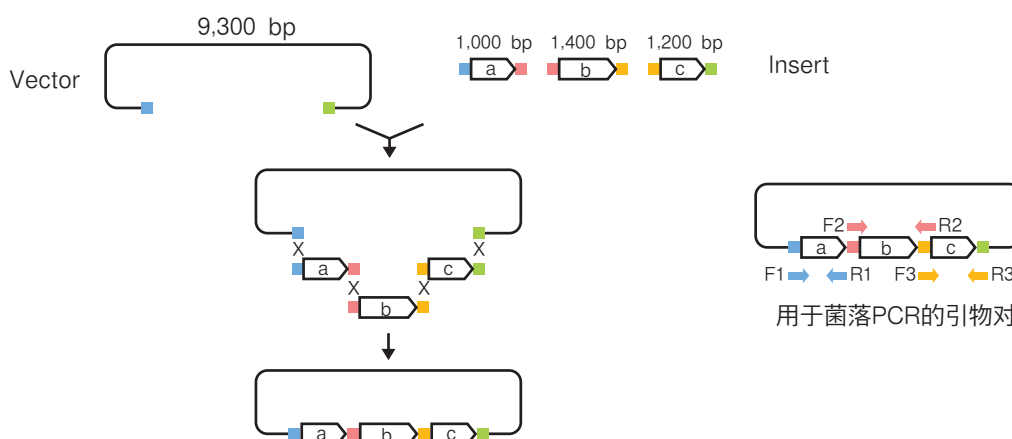
使用In-Fusion® Cloning System同时克隆3个片段（同B公司同类产品的比较）

【数据提供】京都福立大学研究生院 植物病理学研究室 久保先生、深田先生

实验内容

使用In-Fusion HD Cloning Kit和B公司同类试剂盒在9,300 bp的载体中插入1,000 bp、1,400 bp、1,200 bp三个片段，尝试制备总计12,900 bp的载体。

感受态细胞使用Stellar Competent Cells。

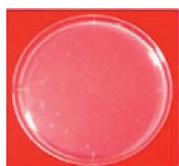


结果

使用克隆试剂盒In-Fusion HD Cloning Kit时，出现了40个菌落。选取其中的10个菌落进行菌落PCR检测后，确认所有菌落都含有正确插入的3个片段。

而使用B公司同类试剂盒时，只长出了一个菌落，进行PCR检菌后，确认含有正确插入的3个片段。

In-Fusion® HD Cloning Kit

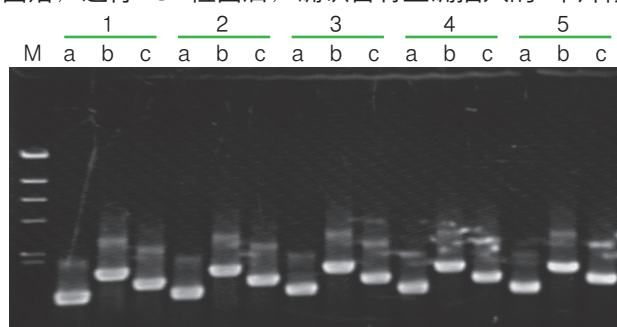


菌落数40个

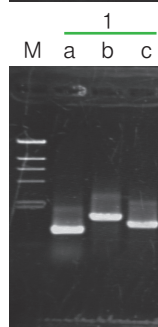
B公司同类试剂盒



菌落数1个



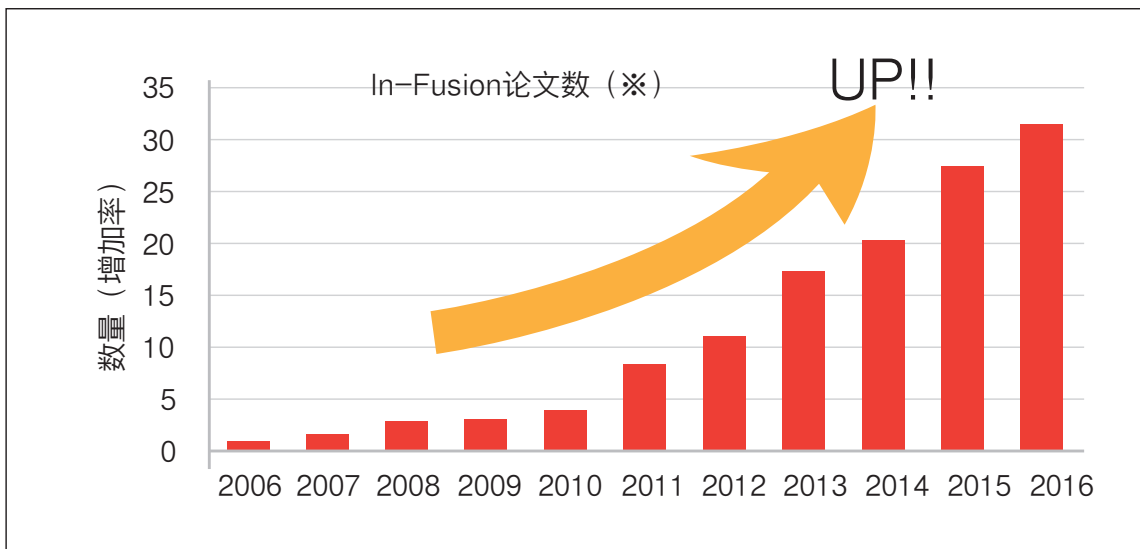
菌落序号
Insert 片段名



M: λ -Hind III digest

★ 公司官网列举了更多实验例和【用户心声】。

理由-2 逐年增加的发表文献



※：使用Google Scholar统计In-Fusion Cloning相关文献，以2006年的论文数为1显示增加率。

逐年上升的增加率正显示了产品的可信赖性。

◆ 使用文献例 ◆

CRISPR系统中，使用In-Fusion HD Cloning Kit 构建Cas9表达载体实验例

Gilbert LA, *et al.*, CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell*, 2013 Jul 18; 154 (2) :442-451.

使用In-Fusion HD Cloning Kit构建文库质粒实验例，开通高通量四分体分析方法。

Ludlow CL, *et al.*, High-throughput tetrad analysis. *Nat Methods* , 2013 Jul; 10 (7) :671-675

使用In-Fusion与PrimeSTAR构建质粒实验例

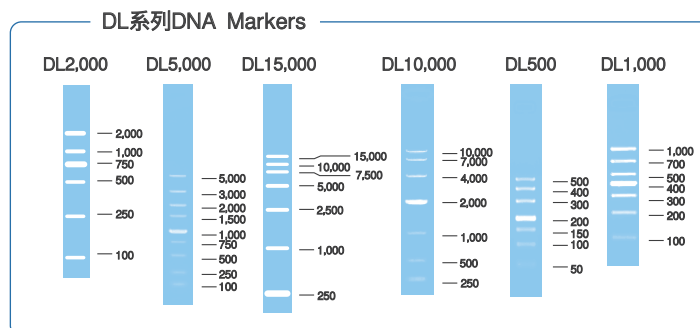
Kondo T *et al.*, Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination. *Nature* , 2013 Feb 7; 494 (7435) :125-129



克隆实验时，DNA的检出、定量是不可缺少的操作过程。而凝胶电泳是DNA常用的检出手法。

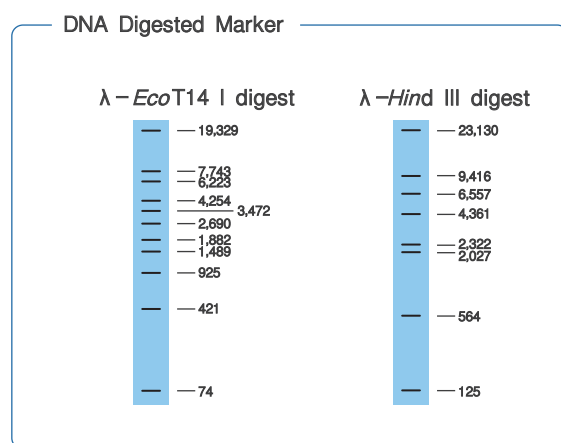
DL系列DNA Marker

制品名称	Code No.	包装量
DL2,000 DNA Marker	3427A	约100 次
DL5,000 DNA Marker	3428A	约100 次
DL15,000 DNA Marker	3582A	约100 次
DL10,000 DNA Marker	3584A	约100 次
DL500 DNA Marker	3590A	约100 次
DL1,000 DNA Marker	3591A	约100 次

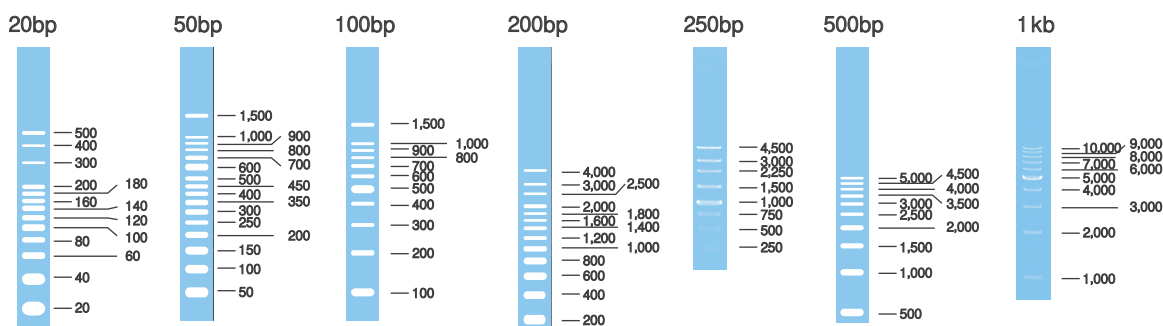


DNA Ladder & Digested Marker

制品名称	Code No.	包装量
20 bp DNA Ladder (Dye Plus)	3420A	100 次
50 bp DNA Ladder (Dye Plus)	3421A	100 次
100 bp DNA Ladder (Dye Plus)	3422A	100 次
200 bp DNA Ladder (Dye Plus)	3423A	100 次
250 bp DNA Ladder (Dye Plus)	3424A	100 次
500 bp DNA Ladder (Dye Plus)	3425A	100 次
1 kb DNA Ladder (Dye Plus)	3426A	100 次
λ -Eco T14 I digest	3401	100 μ g
λ -Hind III digest	3403	100 μ g



DNA Ladder Marker



* 更多凝胶电泳相关Agarose、常用缓冲液方便装、电泳仪等相关产品信息，请从Takara网站中的电泳相关制品中获取详情。

- 本宣传页上登载的制品，都是以科研为目的。请不要用于其它方面，如：不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可，严禁产品的转售·转让、以转售·转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可信息请在本公司网站上确认：<http://www.takarabiomed.com.cn/>。
- 本宣传页上登载的公司名称及名称即使没有特殊标注，使用的也是各公司的商标或注册商标。
- 本宣传页上记载的产品信息是2019年1月1日的信息，最新信息请参考公司官网。