



产品说明书

产品名称: XK pTOPO-TA/Blunt Simple Cloning Kit

产品货号: XKL0606

产品信息:

产品组成	XKL0606-20 (20 次)	XKL0606-60 (20 次×3)
XK pTOPO-TA/Blunt Simple Vector (20ng/μl)	20 μl	20 μl×3
10×Toposmart	20μl	20 μl×3
Control Insert LacZα	5μl	5 μl
M13F(-47) Primer(使用前加入 45 ul ddH ₂ O)	0.1 OD	0.1 OD
M13R(-48) Primer(使用前加入 45 ul ddH ₂ O)	0.1 OD	0.1 OD

保存条件: -20 °C 保存

产品介绍:

XK pTOPO-TA/Blunt Simple Cloning Kit 利用痘苗病毒的拓扑异构酶 I (Topoisomerase I) 的切割再连接的特点将片段克隆到载体中。不同于使用 T4 DNA 连接酶的传统克隆方法, 可在数分钟甚至数秒内高效连接 DNA 片段, 可兼容 TA 克隆与平末端克隆。试剂盒中的载体为线性化的质粒。可以用引物 M13F(-47)和 M13R(-48)进行菌落 PCR 鉴定阳性克隆。载体上具有氨苄青霉素 (Amp) 和卡那霉素 (Kan) 双抗性, 有助于减少卫星菌落, 便于后续挑取阳性克隆。本产品无自连、零背景, 无需蓝白斑筛选, 阳性克隆比例高, 极少出现空载体, 是简单、快速、零背景免筛选的 TOPO 通用型克隆试剂盒。

注: 载体不含 LacZ 基因, 不能进行蓝白斑筛选。

产品特点:

- (1) 连接反应仅需 5 分钟。
- (2) 适用于平末端 PCR 产物和带 A 尾的 PCR 产物。
- (3) 载体采用了新的制备工艺, 零背景, 无需蓝白斑筛选。
- (4) 克隆位点两旁都有 Sma I, 适合单酶切鉴定。
- (5) 载体的多克隆位点两侧具有 SP6 和 T7 RNA 聚合酶启动子序列, 可用于体外 RNA 转录。
- (6) 载体具有氨苄青霉素和卡那霉素双抗性基因。

操作步骤:

1. 连接反应

按照下表在 0.2ml PCR 管中依次加入如下成分: (此步骤不需要在低温条件下(冰水浴)上操作)

成分	体积
DNA 片段	0.5-8 μl
XK pTOPO-TA/Blunt Simple Vector	1 μl
10×Toposmart	1 μl
补水至总体积	10 μl

加完试剂后, 轻轻混匀低速离心, 使溶液集中在管底。

2. 反应温度及片段要求

室温下 (20-30°C) 放置 5-15 分钟, (推荐使用 PCR 仪控制温度。可以设置 25°C 反应 5-15 分钟。如果 PCR 产物电泳检测仅有很锐利明亮的条带, 无引物二聚体和非特异性条带存在, 可直接取 0.5-1 μl PCR 产物原液进行克隆)。然后将离心管放置在冰上。如当天不进行转化实验。请将连接产物置于 -20°C 保存。

注意: DNA 片段的用量见下表

片段大小 (bp)	最佳用量 (ng)
100-1000	20-50
1000-2000	50-100
2000-5000	100-200

3. 阳性对照反应

取 1μl 试剂盒提供的 1kb 长度的对照 Control Insert LacZα 片段进行克隆, 转化有 α 互补功能的大肠杆菌感受态细胞 (如 DH5α, TOP10, Mach1-T1 等)。菌液涂布在 IPTG, X-gal 的 LB 氨苄平板上, 次日蓝色菌落为阳性克隆, 说明有片段插入, 白色菌落为空载体。

4. 转化

- (1) 取 5 μl 连接产物到 100 μl 刚刚融化的感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰浴 20-30 分钟。
- (2) 42°C 水浴中热击 30 秒钟。
- (3) 立刻置于冰水浴中 2 分钟。
- (4) 加入 900 μl 无菌的不含抗生素的 SOC 或 LB, 37°C, 200rpm 振荡培养 60 分钟。
- (5) 4000 rpm 离心 1 分钟, 去掉部分上清, 保留 100 μl 用移液器轻吹菌体, 充分悬浮菌液, 取全部菌液涂布, 然后 37°C 培养过夜 (12-16 小时)。

5. 阳性克隆鉴定:

(1) 菌落 PCR 方法鉴定阳性克隆

① 用 10 μl 吸头挑选克隆至预先加有 10 μl 无菌水或 LB 培养基的 PCR 管中, 吹打混合。

② 在 25 μl PCR 反应体系中加入 2 μl 细菌悬液为模板、M13F 和 M13R 各 1 μl, PCR 方法鉴定阳性克隆。

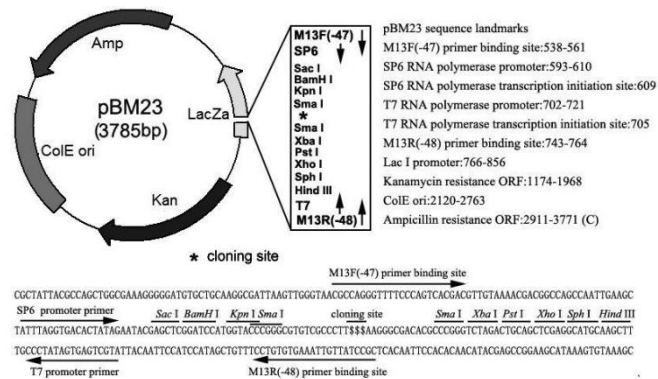
③ M13 引物 PCR 扩增条件: 95°C 预变性 5 分钟 (裂解细胞, 失活核酸酶), 94°C 变性 10 秒钟, 55°C 退火 10 秒钟 (注: 使用基因特异性引物做 PCR 鉴定时, 退火温度则需按其最适温度进行调整), 72°C 延伸适当时间 (根据片段的大小决定延伸时间, 通常每 1-2 分钟/1kb), 30-35 个循环, 72°C 后延伸 5 分钟。1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果, 有强烈的明显条带的克隆为重组体, 与插入片段大小相近 (由于 M13 引物在克隆位置的两侧, 所以 PCR 扩增出的 DNA 的长度比插入片段大 227 bp) 可视为阳性克隆。菌落 PCR 方法鉴定重组体时一定要设立一个不加菌液的阴性对照。

(2) 限制性酶切分析阳性克隆

挑取单菌落接种于 3-5mL 含氨苄或卡那的 LB 培养液中, 过夜培养, 小量制备质粒。参考 pBM23 图谱, 选择合适的限制性内切酶, 酶切后电泳鉴定重组质粒。

(3) 测序: 用 M13F 和 M13R 对质粒进行测序分析。

pBM23 载体图谱



常见问题分析

重组子克隆菌少, 或阳性率低:

- (1) 感受态效率低, 使用转化效率 $> 5 \times 10^7$ cfu/μg 的感受态细胞
- (2) 连接反应不需在低温下 (如放碎冰上) 操作, 应该在室温下操作。
- (3) PCR 片段加入量太多或太少, 按照推荐量加入。
- (4) PCR 纯度低, 重新扩增或重新纯化 PCR 产物。
- (5) PCR 质量低, 切胶时在紫外下照射时间长, 需重新制备。
- (6) PCR 扩增结束后, 应该再延伸 5-10 分钟, 确保片段延伸完全。
- (7) 转化后没有复苏培养, 可以加入 SOC 或 LB, 培养 60 分钟。
- (8) 克隆基因可能对宿主菌有毒性, 比如某些编码膜蛋白和 DNA 结合蛋白的基因, 某些启动子和调节序列基因, 或含有倒置或串联重复序列的基因, 选用室温过夜培养平板。



载体序列

>pBM23(3785bp)

AATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACA
AATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTA
TAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCT
CCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTG
GCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATAC
CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCCGATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA
TCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCA
GGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTA AACGACGGCCAGCCAATTGAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACGAGCT
CGGATCCATGGTACCCGGGCGTGTGCCCCTAAGGGCGACACGCCCGGGTCTAGACTGCAGCTCGAGGCATGCAAGCT
TTGCCCTATAGTGAGTCGATTACAATTCCATCCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACAC
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCG
CTCACTGCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGG
TTTGGTATTGGGCGCTTTCGCTTCCGCTCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCA
GCTCACTCTGGACAGCAAGCGAACCGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTA
AACTGGATGGCTTTCTTGCCGCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATC
GTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTG
GGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAA
GACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTC
CTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGAT
CTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATC
CGGCTACCTGCCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA CTGGATGGAAGCCGGTCTTGTCG
ATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCC
GACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGAAAATGGCCGCTTTTCTGGA
TTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG
CTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATC
GCCTTCTGACGAGTTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGT
ATTCACACCGCGGATCTGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAA
AAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAG
CATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGG
AAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTG
GCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC
CCCCGTTACGCCCACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCC
ACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGC
CTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAA
AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACACGTTAAGGGA
TTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAG
TATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTG
TCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCA
ATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAG
AAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTT
AATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCAATCAGCT
CCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGGA
TCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCC



ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTG
CTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTT
TTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATC
TTCAGCATCTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAA
GGGCGACACGGAAATGTTGA ATACTCATACTCTTCCTTTTTC