



KT Blunt Simple Cloning Kit

目录号

MG-KL-02

产品组成

组分	规格 (20 次)
pTOPO001 Blunt Simple Vector (30 ng/μL)	20 μL
Control Template (1000 bp, 30 ng/μL)*	5 μL
10×Topo Buffer	20 μL

*阳性对照片段，用于对照组实验，检测插入片段的质量。

保存条件

-20°C保存 12 个月。

产品简介

本产品是基于拓扑异构酶 (Topoisomerase) 能够快速高效连接 DNA 片段的原理，结合独特生产工艺制成的一款快速平末端克隆试剂盒，可高效替代基于 T4 连接酶的传统克隆。

产品中包含的 pTOPO001 Blunt Simple Vector 在插入位点两侧不含多克隆酶切位点，可有效连接 10 kb 以内 DNA 片段，并利用自杀基因零背景技术，解决了载体自连造成的假阳性困扰，无需繁琐的蓝白斑筛选操作，阳性率高达 95%。

产品特点

- ◇ 快速连接：5min 内完成连接反应；
- ◇ 长短片段均适用：可连接 10kb 以内 DNA 片段；
- ◇ 低背景：利用自杀基因零背景技术，可见即有插入，阳性率高达 95%。

适用范围

本产品适用于 10kb 以内 DNA 片段的平末端克隆。

本产品仅供科研使用



注意事项

1. 目的片段的 PCR 引物不能磷酸化;
2. PCR 产物建议进行胶回收纯化, 避免非特异性扩增和引物二聚体的影响。纯化后, 对回收产物进行琼脂糖凝胶电泳确定产物浓度;
3. 连接反应不能在冰上进行, 请严格按照说明书推荐温度进行;
4. 请勿使用耐受 ccdB 自杀基因的感受态转化, 推荐使用常规的 DH5 α 或 TOP10 感受态;
5. 测序时使用引物: M13F (TGAAAACGACGGCCAGT) 和 M13R (CAGGAAACAGCTATGACC), 请勿使用引物 M13F (-47) /M13R (-48) 。

使用方法

操作示例

1. PCR 产物的准备

- (1) 引物要求: 引物不能磷酸化;
- (2) 产物末端: 产物为平末端;
- (3) 产物纯化: 对 PCR 产物进行凝胶回收纯化, 电泳检测回收产物浓度后再进行连接反应。

2. 反应体系的配制

- (1) 按下表配制 10 μ L 反应体系 (此步骤需在室温 (20~30 $^{\circ}$ C) 进行, 不能在冰上进行!) :

组分	体积
纯化后的 PCR 产物 ^a /Control Template ^b	0.5~8 μ L
pTOPO001 Blunt Simple Vector	1 μ L
10 \times Topo Buffer	1 μ L
dd H ₂ O	Up to 10 μ L

- a. 不同大小插入片段的推荐用量:

插入片段大小 (bp)	推荐用量 (ng)
100~1000	10~40
1000~2000	40~80
2000~5000	80~150

- b. 若需要设置对照组实验, 可加入 1 μ L Control Template(1000 bp,30ng/ μ L)。
- (2) 将所有组分轻轻吹打混匀, 低速离心收集至管底。

3. 连接反应

本产品仅供科研使用



将上述连接体系置于 PCR 仪或金属浴中 (20~30°C) 反应 5min, 反应完成后立即转化, 请勿置于冰上或冰箱中, 否则会降低连接效率。

4. 转化

- (1) 取 100 μ L 冰浴上融化的感受态细胞, 加入 10 μ L 连接产物, 轻柔混匀, 冰上静置 30min;
- (2) 42°C 水浴热激 45s, 迅速冰上静置 2min (注意不要晃动离心管, 以免降低转化效率);
- (3) 向离心管中加入 700 μ L 不含抗生素的无菌培养基 (2 \times YT 或 LB), 混匀后 37°C, 200rpm 复苏 1h (小片段等简单连接可适当缩短复苏时间);
- (4) 根据实验需求吸取不同体积的感受态细胞加到含有相应抗生素的 2 \times YT 或 LB 固体培养基上, 均匀涂开后吹干平板, 将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养。

5. 阳性克隆的鉴定

(1) 菌液/菌落 PCR 检测 (3k 以内片段推荐)

用枪头挑取白色单菌落到 10 μ L 的无菌水中混匀后取 1 μ L 为模板, 或直接蘸取菌落至 PCR 体系中进行扩增。推荐使用载体通用引物 (M13F 和 M13R);

(2) 以质粒为模板 PCR 检测 (3k 以上片段推荐)

挑取单克隆接种于 LB/Amp 培养基中, 37°C 250rpm 过夜摇菌后抽提质粒, 以质粒为模板, 使用载体通用引物 (M13F 和 M13R) 或片段特异性引物进行扩增;

(3) 限制性酶切分析 (可选)

挑取单克隆接种于 LB/Amp 培养基中, 37°C 250rpm 过夜摇菌后提取质粒, 使用相应内切酶进行酶切, 电泳检测酶切片段大小;

(4) 测序

使用 M13F(TGTAAAACGACGGCCAGT)及 M13R(CAGGAAACAGCTATGACC)进行测序, 请勿使用引物 M13F (-47) /M13R (-48)。

常见问题与解决办法

Q1: 克隆数少或不长克隆?

A1:

- (1) 连接片段纯度差。PCR 产物建议胶回收纯化, 电泳或仪器检测胶回收产物浓度后再进行连接反应。不推荐多管样品过一个柱子的方式回收 DNA, 会造成更多的 EDTA、胍盐等杂质残留, 抑制反应。用于连接反应的胶回收产物请勿使用 TE 进行保存;
- (2) 连接片段用量过多或过少。请严格按照说明书推荐的用量进行体系配制;
- (3) 连接体系置于冰上配制。低温会降低 Topo 酶连接效率, 需在室温配制反应体系。建议即连即转, 请勿置于冰上或冰箱;
- (4) 转化操作不当。请严格按照本说明书或相应感受态说明书转化流程 (注意热激温度和热激时间) 进行实验;



- (5) 感受态效率低。自制感受态随着保存时间的增加，效率可能会降低，建议尽量使用新鲜感受态或高效商业化感受态；
- (6) 平板抗性使用错误。载体抗性为 Amp，推荐使用浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Q2: 多数克隆不含插入片段?

A2:

- (1) PCR 产物中含较多非特异性扩增产物。建议优化引物及 PCR 条件，提高产物特异性；PCR 产物需要切胶纯化；非特异小片段包裹在目的条带中未分离，使用低浓度琼脂糖凝胶、低电压长时间电泳分离；通过增加鉴定的克隆数量来筛选阳性克隆子；
- (2) 环境污染引入杂片段。建议定期更换电泳液、清洁切胶仪器、使用灭菌的实验耗材等，可使用核酸清洁剂清洁实验环境；
- (3) 在错误的紫外波长下切胶。建议在长波 (365nm) 紫外条件下切胶 (时间不宜超过 5min)，短波 (254nm) 紫外易造成 DNA 损伤。

Q3: 阳性克隆送测，目的片段两端碱基缺失或突变?

A3:

- (1) 使用的酶类制品保真度低。建议更换保真度较高的 PCR 酶类进行扩增；
- (2) 引物质量欠佳。化学合成的引物存在一定碱基缺失或突变的机率，建议多挑克隆或重新合成引物；
- (3) PCR 反应没有充分延伸。建议延长终延伸时间；
- (4) 在错误的紫外波长下切胶。建议在长波 (365nm) 紫外条件下切胶，切胶时间不宜超过 5min。