

使用前请务必仔细阅读英文说明书

产品编号：C5851、C5852、C5857、C5861、C5862、C5867

产品特点：

- 适用于 pfu 、KOD等高保真聚合酶扩增的平末端片段的克隆；
- 连接+转化，最快只需5min；
- 载体不含LacZ基因，无需通过蓝白斑筛选，因此不需使用含有IPTG、X-gal的培养基平板；
- 对照插入片段克隆效率可达98%以上；
- PCR产物（仅有目的条带、无非特异条带和引物二聚体）可直接进行克隆，无需纯化。

PCR产物的制备：

1. 扩增引物不能磷酸化；
2. 使用 pfu 、KOD等产生平末端片段的高保真DNA聚合酶；
3. 为保证扩增产物的完整性，PCR循环结束后，再延伸5-10min，确保片段延伸完全。
4. PCR反应结束后，电泳检测PCR产物的产量和质量。

克隆反应体系：

1. 室温下(20-30℃)，按照如下体系操作：

PCR扩增好的DNA片段	0.5–8 μ L
pCloneEZ-TOPO载体	1 μ L
10×Enhancer	1 μ L
ddH ₂ O	X μ L
总反应体积	10 μ L

加完试剂后，轻轻混匀，然后低速短暂离心，使溶液集中在离心管底。**此步不要在低温条件下(如碎冰)上操作。**

2. 室温下(20-30℃)放置0-5min，然后将离心管放置于冰上。如当天不进行转化实验，请将连接产物放-20℃保存。

注意：

- ① DNA片段用量如下表：

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

- ② 室温下(20-30℃)，反应时间不要超过5min。如果室温较低，推荐使用PCR仪控温，可设25℃反应5min。
- ③ 如果PCR产物电泳检测仅有很亮目的条带，无非特异条带和引物二聚体，可取0.5-1 μ L PCR原液直接进行克隆。
- ④ 阳性对照反应：取1 μ L试剂盒提供的对照片段LacZ基因进行克隆。转化后，菌液涂在含有IPTG、X-gal的培养基平板，过夜培养。蓝色菌落为阳性克隆，说明有LacZ基因的插入，白色菌落为载体自连的空载体。

转化：

1. 取5 μ L连接液至50-100 μ L刚刚融化的DH10B感受态细胞中，轻轻混匀，冰浴2-30min。

2. 42℃水浴中热激30sec。
3. 立即放置于冰上静置2min。
4. 加入300-500 μ L无菌SOC或LB培养基(不含抗生素)，37℃，200-250rpm振荡培养60min。
注：<2kb片段连AMP载体可以不复苏，直接涂平板。
5. 吸取200 μ L菌液铺板，为得到更多克隆，可先3000g离心2min，弃掉部分上清，用移液器轻吹菌体，至充分悬浮，取全部菌液涂板，然后37℃培养过夜(12-16h)。

阳性重组子的鉴定：

(1) 菌落PCR法：

1. 挑取大小中等的克隆菌至10 μ L无菌水中，充分混合。
2. 取2 μ L混合液作为PCR反应的模板，用试剂盒提供的M13F/M13R作为鉴定重组子的引物。

3. PCR反应条件：

94℃	2 min	} 30 cycles (根据片段的大小确定延伸时间)
94℃	30 sec	
56℃	30 sec	
72℃	1 kb/min	
72℃	10 min	

4. 取10 μ L PCR产物电泳鉴定，若载体自连，则引物M13F/M13R扩增出片段大小为143bp。
5. 确认重组子后，将剩下的8 μ L混合液转接到LB培养基中(含相应抗生素)，过夜摇菌培养，然后抽提质粒，用M13F/M13R测序。

(2) 限制性酶切法：

1. 挑取大小中等的克隆菌至LB培养基中(含相应抗生素)，过夜摇菌培养，然后抽提质粒。
2. 用EcoRI/EcoRV/PstI、或合适的限制性内切酶，酶切鉴定重组子。

测序：

用M13F、M13R通用引物测序，然后进行序列分析。

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/ μ g的感受态细胞；
- ② 连接反应在低温下(如放碎冰上)操作，应在室温下操作；
- ③ 连接反应时间过长，室温下放置5min即可，过长效率会下降；
- ④ PCR产物加入量太少或太多，按照推荐量加入；
- ⑤ PCR产物纯度低，重新扩增或重新纯化PCR产物；
- ⑥ PCR产物质量低，切胶时紫外照射时间长，重新制备；
- ⑦ PCR循环结束后，应再延伸5-10min，确保片段延伸完全；
- ⑧ 转化后没做复苏，可加入SOC/LB培养基，振荡培养60min；
- ⑨ 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，或换用低拷贝质粒载体。

注意：快速克隆步骤仅限使用随试剂盒提供的感受态细胞。