

GV TOPO-TA-Amp Cloning Kit

Cat #: GT1505-20T

产品规格：20T

保存与运输：-20℃。

本试剂盒适用于 Taq DNA 聚合酶扩增的 10 kb 以下的末端加“A”的 PCR 片段的快速克隆。通过酶切或机械剪切获得的 DNA 片段经 Taq DNA 聚合酶扩增后，也可用该试剂盒克隆。该试剂盒中含有牛痘病毒拓扑异构酶 I，牛痘病毒拓扑异构酶 I 能够识别载体上的 5'-CCCTT-3' 片段，并在该片段的 3' 端形成 3'-磷酸基，与载体共价结合形成中间体。该酶同时具有限制性内切酶和连接酶活性，能够将切开的载体片段和具有 5'-OH 的 DNA 片段迅速连接起来。

一、试剂盒组成

成分	规格
TOPO-TA cloning vector (20ng/μl)	20μl
10×TOPO Buffer	20μl
Control Insert(422bp)(30ng/μl)	10μl
M13F Sequencing Primer (10μM)	50μl
M13R Sequencing Primer (10μM)	50μl
Handbook	1

二、产品特点

- 1、适用于 Taq 系列 DNA 聚合酶扩增的末端加“A”片段的克隆。
- 2、连接只需 5 min。
- 3、载体不含 LacZ 基因，无需蓝白斑筛选。
- 4、优质 PCR 产物（无非特异性条带、无引物二聚体）可直接进行克隆，无需纯化。

三、PCR 产物的制备：

- 1、扩增引物不能磷酸化。
- 2、使用 Taq 系列的 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，确保末端加“A”完全。
- 4、PCR 反应结束后，电泳检测 PCR 产物产量和质量，若有非特异性扩增或引物二聚体，则需切胶回收目的条带后进行克隆。

四、操作步骤

克隆反应：

- 1、室温下，按下表配制反应体系：

试剂	添加量
DNA 片段	0.5-8 μl
TOPO-TA cloning vector	1 μl
10×TOPO Buffer	1 μl
ddH ₂ O	x μl

连接反应体系的总体积为 10μl（用 ddH₂O 补足）。轻弹离心管将反应体系混匀，短暂离心 3-5s。

注：整个操作过程均在室温条件下进行，切勿在冰上操作。

如果 PCR 产物电泳检测仅有很亮的目的条带，无非特异性条带和引物二聚体，可取 **0.5-1μl**PCR 产物原液直接进行克隆

- 2、将离心管于室温（22-30℃）下静置 0-5 min（不可超过 5 min）。反应结束后将离心管放置在冰上，进行后续的转化操作。

注：室温下（22-30℃）反应时间不可超过 **5 min**，时间过长克隆效率会下降。若室温较低，建议使用 PCR 仪控温，可设置 **25℃**反应 **5min**。若连接产物未能立即用于转化，需保存于 **-20℃**。不建议对连接产物做长期保存。

- 3、阳性对照实验：

取 1μl 试剂盒提供的对照片段进行克隆、转化后，将菌液涂布在含有相应抗生素的培养平板上，37℃培养过夜。取菌斑进行 PCR 扩增。

附：不同长度的 DNA 片段的最适添加量参照表：

DNA 片段大小 (bp)	最适添加量 (ng)
100-1000	20-50
1000-2000	50-100
2000-5000	100-200

转化（此操作需在无菌条件下进行）：

- 1、取 5 μl 连接产物加入到 50-100 μl 刚刚融化的 DH10B 感受态细胞中（感受态细胞应刚从-80℃取出，于冰上融化，刚刚融化便加入连接产物），温和混匀，冰浴 2-30 min。
- 2、42℃水浴热激 30s。（勿晃动离心管）
- 3、立即转移到冰上，静置 2 min（冰浴期间勿晃动离心管）。
- 4、加入 300-500 μl LB 培养基（不含抗生素），37℃，200-250 rpm 振荡培养 60 min。

注：当插入片段的长度 < 2 kb 时，可省略复苏步骤（步骤 4），直接将转化后的菌液涂布在含氨苄青霉素的平板上，37℃培养过夜。

- 5、取 200 ul 菌液，涂布于含氨苄青霉素的平板上，37℃培养过夜。

注：若想获得更多克隆，可将菌液低速（3000 g）离心 2 min，弃掉部分上清液，用移液器吹打至菌体完全重悬，吸取全部菌液涂布于含氨苄青霉素的平板上，37℃培养过夜。

检测：

- 1、菌落 PCR 法（无菌操作）：

- (1) 挑选单菌落至 10 μl 无菌水中，充分混匀。
- (2) 取 2 μl 菌液作为 PCR 反应的模板，用试剂盒提供的 M13F/M13R 引物扩增插入片段。

- (3) PCR 反应条件

94℃ 2 min

94℃ 30 sec

56℃ 30 sec 30 cycles

72℃ 1 kb/min （根据片段大小确定延伸时间）

72℃ 10 min

- (4) 电泳检测 PCR 产物，若载体自连，则扩增出的片段大小为 143 bp。

- (5) 确定重组子后将剩余的 8 μl 菌液转接到 LB 培养基中（含相应的抗生素），摇菌培养过夜，然后提取质粒进行测序。

- 2、限制性酶切法：

- (1) 挑取单克隆至 LB 培养基中（含相应抗生素），过夜摇菌，抽提质粒。

- (2) 用 EcoRI/EcoRV/PstI 或合适的限制性内切酶，对质粒进行酶切，鉴定重组子。

测序:

用 M13F 和 M13R 通用引物测序, 然后进行序列分析。

M13F: 5' -TGTAACACGACGGCCAGT-3'

M13R: 5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3'

五、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 $>5 \times 10^7$ fcu/ μ g 的感受态细胞;
- 2、连接反应在低温下 (如碎冰上) 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, 时间过长效率会下降;
- 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, 切胶十紫外照射时间长: 使用蓝光切胶仪切胶或加快切胶速度, 减少 PCR 产物在紫外下暴露的时间;
- 7、转化后没有做复苏: 可加入 LB 培养基 (无抗生素) 震荡培养 60min;
- 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。

附: 载体图谱

