

上海吉象生物科技有限公司

快速拓扑克隆试剂盒

(topo smart cloning kit)

产品信息：

组成	8900 (20次)	8920 (20次×5)
NC-23 Vector (20ng/μl)	20μl	20μl×3
10×Toposmart	20μl	20μl×3
Control Insert LacZα	5μl	5μl
M13F(-47) Primer(使用前加入45ul ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3
M13R(-48) Primer(使用前加入45ul ddH ₂ O)	0.1OD	0.1OD×3

保存条件： -20 °C保存一年

产品介绍：

NC-23 Toposmart克隆试剂盒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。不仅适用于克隆由Pfu sPfu KOD Xerox Phusion 和Q5等高保真DNA聚合酶扩增的平末端PCR产物，也可克隆由Taq、Taqplus、Tth和klenTaq等DNA聚合酶扩增的带A尾的PCR产物。试剂盒中的NC-23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) PCR产物末端通用。
- (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

成分	体积
DNA 片段	0.5-8μl
NC-23 Vector	1μl
10×Toposmart	1μl
补水至总体积	10μl

按下表，在一个 0.2ml PCR 管中依次加入加完试剂后，轻轻混匀低速离心，使溶液集中在管底。

注意：此步骤不需要在低温条件下（冰水浴）上操作。

2. 反应温度及片段要求

室温下 (20-30℃) 放置 5-15 分钟 (推荐使用 PCR 仪控制温度。可以设置 25℃ 反应 5-15 分钟。如果 PCR 产物电泳检测仅有锐利明亮的条带, 无引物二聚体和非特异性条带存在, 可直接取 0.5-1 μ l 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℃ 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 1 μ l 试剂盒提供的 1kb 长度的对照 Control Insert LacZ α 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 DH5 α , 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

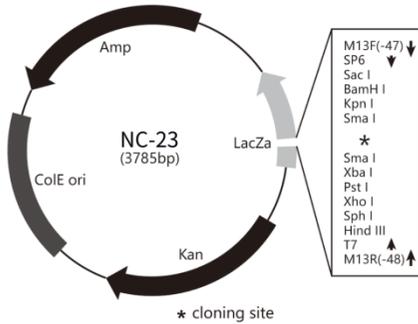
- (1) 取 5 μ l 连接产物到 100 μ l 刚刚融化的感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰浴 20-30 分钟。
- (2) 42℃ 水浴中热击 30 秒钟。
- (3) 立刻置于冰水浴中 2 分钟。
- (4) 加入 900 μ l 无菌的不含抗生素的 SOC 或 LB, 37℃, 200rpm 振荡培养 60 分钟。
- (5) 4000rpm 离心 1 分钟, 去掉部分上清, 保留 100 μ l 用移液器轻吹菌体, 充分悬浮菌液, 取全部菌液涂布, 然后 37℃ 培养过夜 (12-16 小时)

5. 阳性克隆鉴定:

- (1) 菌落 PCR 方法鉴定阳性克隆
 - ① 用 10 μ l 吸头挑选克隆至预先加有 10 μ l 无菌水或 LB 培养基的 PCR 管中, 吹打混合。
 - ② 在 25 μ l PCR 反应体系中加入 2 μ l 细菌悬液为模板、M13F(-47) 和 M13R(-48) 各 1 μ l, PCR 方法鉴定阳性克隆。
 - ③ M13 引物 PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 5 分钟 (裂解细胞, 失活核酸酶), 94℃ 变性 10 秒钟, 55℃ 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℃ 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℃ 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 227bp) 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 NC-23 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(-47) 和 M13R(-48) 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/ μ g 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

>NC-23 (3785bp)

```
AATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAA  
CAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATT  
AACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGAC  
ACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGCTGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGG  
TCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTAACTATGCCGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCA  
TATGCCGTGTGAAATACCCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCCATTTCAGGCTGC  
GCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGTGCA  
AGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTA AACGACGCGCCAGCCAATTGAAGCT  
ATTTAGGTGACACTATAGAATACGAGCTCGGATCCATGGTACCCGGCGTGTCCGCTT$$$AAGGGCGACACG  
CCCGGGTCTAGACTGCAGCTCGAGGATGCAAGCTTTGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCCATCCATAGC  
TGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCC  
TGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCT  
GTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGCCAACGCGCGGGAGAGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTCCGCTT
```

CCTCGCTACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTACTCTGGACAGCAAGCG
AACCGAATGCCAGCTGGGGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTCTTTG
CCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGA
ACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGA
CAATCGGCTGCTCTGATGCCCGGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCCCGGTTCTTTTGTCAAACCGAC
CTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGGTTCTTTG
CGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTTGGCGAAGTGGCGGGCAGGATC
TCCTGTATCTCACCTTGCTCTGCGGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGGCGGGCTGCATACGCTT
GATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGG
TCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCAACTGTTCCGACAGGCTCAAG
CGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGGCGAATATCATGGTGGAAAAT
GGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCCTATCAGGACATAGCGTTGGCTAC
CCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCTGCTGCTTTACGGTATGCCCGCTCCCG
ATTCGACGCGCATCGCTTCTATCGCTTCTTGACGAGTCTTCTGAATTAATAACGCTTACAATTTCCTGATG
CGGTATTTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCCGGATCTGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAT
CAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGAAACCGTAAAAAGCCCGGTTG
CTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCCTGC
CGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTAT
CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGC
CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTA
ACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACT
AGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATC
CGGCAAAACACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGAAGCAGCAGATTACCGCGCAAAAAAAGGAT
CTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTT
GTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAG
TATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTAT
TTGTTTATCCATAGTTGCTGACTCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC
AGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTACCCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAG
GGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAG
TAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCG
TTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAA
AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGG
CAGCACTGCATAATCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAG
TCATTCTGAGAAATAGTGTATCGCGCAGCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACA
TAGCAGAACTTTAAAGTGTCTATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCAAGGATCTTACCGCTGT
TGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTACGATCTTTACTTTACCAGCGTTTCT
GGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACAGGAAATGTTGAATACTCAT
ACTTCTCTTTTC