

SinoMol Zero Blunt Cloning Kit

产品货号：KBT101

保存条件：-20℃保存 9 个月

产品介绍：

SinoMol Zero Blunt Cloning Kit 利用拓扑异构酶 I(Topoisomerase I)快速切割再连接的特点将片段克隆到载体中。本产品适用于克隆平末端的 PCR 产物。引物 M13F 和 M13R 可用于进行菌落 PCR 鉴定阳性克隆。

产品特点：

- (1) 连接反应仅需 5 分钟；
- (2) 适用于平末端的 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。

注意事项：

- (1) 片段的选择：高保真系列 DNA 聚合酶扩增的 PCR 产物；
- (2) 引物要求：PCR 引物 5'端不能进行磷酸修饰，普通商业化引物即可。
- (3) 产物要求：为保证 PCR 产物完整，建议 72℃后延伸 5~10 分钟。反应结束后，用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的质量和纯度，如 PCR 产物条带单一且无引物二聚体，可直接进行连接，如 PCR 产物为非单一性条带，目的片段一定要切胶回收。

操作步骤：

1. 反应体系

按下表，在一个 0.2ml PCR 管中依次加入：片段浓度低时可选择 10μl 体系

成分	体积	体积
DNA 片段	0.5~4.5 μl	0.5~9 μl
SinoMol Zero Blunt Vector (10ng/ul)	0.5~1μl	1 μl
补水至总体积	5μl	10μl

加完试剂后，轻弹管底混匀，低速离心使溶液集中在管底。**注意：此步骤不要在低温条件下（冰水浴）上操作。**

2. 反应条件

25-30℃反应 5~10 分钟（推荐 PCR 仪控温），片段大于 2000bp 时，连接时间可延长至 15~20 分钟，反应结束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。

最佳片段用量见下表。如 PCR 产物电泳检测仅有明亮的单一条带，且无引物二聚体，可取 0.5~1μl 的 PCR 产物原液直接连接。

片段大小 (bp)	最佳用量 (ng)
100-1000	10~50
1000-2000	50~100
2000-5000	100~150

3. 转化

如果使用的是商品化的感受态细胞，插入片段不超过 2kb，选择快转步骤；如果使用的是实验室自制的转化效率

低的感受态细胞，选择标准转化步骤。

A. 快转步骤

- (1) 取 5 μ l 连接产物到 50~100 μ l 刚刚融化的感受态细胞中，轻轻混匀，冰浴 5 分钟。
- (2) 42°C 水浴中热激，热激时间根据所用的感受态细胞确定，立刻置于冰水浴中 2 分钟。
- (3) 加入 500 μ l 无菌的不含抗生素的 SOC 或 LB，37°C，200rpm 振荡培养 15 分钟。
- (4) 吸取 100 μ l 左右菌液涂布在含**氨苄青霉素**的平板上，37°C 培养过夜。如果预计重组子较少，为得到更多的菌落，可先 4000rpm 离心 1 分钟，去掉部分上清，用移液器轻吹，充分悬浮菌液，取全部菌液涂布。

B. 标准转化步骤

- (1) 取 5 μ l 连接产物到 50~100 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°C 水浴中热激，热激时间根据所用的感受态细胞确定，立刻置于冰水浴中 2 分钟。
- (3) 加入 500 μ l 无菌的不含抗生素的 SOC 或 LB，37°C，200rpm 振荡培养 60 分钟。
- (4) 吸取 100 μ l 左右菌液涂布在含**氨苄青霉素**的平板上，37°C 培养过夜。如果预计重组子较少，为得到更多的菌落，可先 4000rpm 离心 1 分钟，去掉部分上清，用移液器轻吹，充分悬浮菌液，取全部菌液涂布。

4. 阳性重组子的鉴定

- (1) 菌落 PCR 方法鉴定阳性克隆
 - ① 用 10 μ l 吸头挑选克隆至 10 μ l 无菌水中，吹打混合。
 - ② 25 μ l PCR 反应体系：取 1 μ l 细菌悬液为模板、加入 5 μ M 浓度的 M13F/M13R 各 1 μ l 进行 PCR 扩增。
 - ③ PCR 扩增条件：95°C 预变性 5 分钟，94°C 变性 10 秒，55°C 退火 10 秒，72°C 延伸 X 分钟（根据片段的大小决定延伸时间），30 个循环，72°C 后延伸 5min。
 - ④ 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。
- (2) 限制性内切酶酶切鉴定阳性克隆：挑取白色菌落，接种于含**氨苄青霉素**的液体培养基中培养一定时间后，抽提质粒，根据载体图谱选取合适的内切酶酶切，1% 琼脂糖凝胶电泳分析是否连接上目的片段。
- (3) 测序：用 M13F、M13R 通用引物对阳性质粒进行测序分析。

5. 载体图谱

