

克  
必  
隆  
系  
列

CAT#:51104-2  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

# 克必隆 B 载体 MagicVector B

使用手册 V1.5

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506  
网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)



<p><b>自备试剂</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 外源 DNA 片段。如果含又 DNA 片段的反应液中不含其他载体 DNA (如酶切反应液, PCR 反应液), 可以不需要凝胶回收, 灭活酶后即可直接将反应液用于连接反应。PCR 引物 5' 端一般为 OH 基团, 最好在 PCR 后用 T4 激酶磷酸化, 否则连接效率极低。</li> <li>2. 感受态宿主菌。DH5α, DH10B 或 HB101 等常用 E. coli 菌株。</li> <li>3. 连接反应试剂。请购买现成试剂盒。</li> <li>4. 选择培养基。在倒 LB 平板之前随产品赠送的选择液和 Amp (如果附赠的选择液含 Amp, 则不必须额外加 Amp) 按比例加入到 LB 之中, 使选择液终浓度为 1X, Amp 终浓度为 50 ug/mL (如果附赠的选择液含 Amp, 稀释到 1X 后 Amp 的终浓度即为 50 ug/mL), 混匀后倒盘。</li> </ol>
<p><b>使用方法</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 连接反应 <ol style="list-style-type: none"> <li>a. 取新的经过灭菌处理的 0.5 ml Eppendorf 管, 编号。</li> <li>b. 将 100 ng 载体 DNA 转移到无菌离心管中, 加两倍摩尔量的外源 DNA 片段, 折合成重量(ng) = (外源 DNA 片段 bp 数 X 100 ng X2)/5330 bp (载体 DNA 长度)</li> <li>c. 加蒸馏水至体积为 8 μl, 于 45℃保温 5 分钟, 使重新退火的粘端解链。将混和物冷却至 0℃。平末端 DNA 片段的克隆可以省去 45℃保温 5 分钟这一步。</li> <li>d. 加入 10×T4 DNA ligase buffer 1μl, T4 DNA ligase 0.5 μl, 混匀后用微量离心机将液体全部甩到管底, 于 16℃保温 1-24 小时。</li> <li>e. 同时做只有外源 DNA 片段没有质粒载体的组对照反应。没有必要做只有质粒载体而无外源 DNA 的对照组, 因为自身环化的载体不能生长, 能够生长的转化子基本上是两个载体分子相互连接形成的新载体。但在有两倍于外源 DNA 片段存在的情况下, 两个载体分子连接的机率很小。</li> </ol> </li> <li>2. E. coli 感受态细胞的转化 <ol style="list-style-type: none"> <li>a. 各取每组连接反应液 2 μl 按标准方法转化 E. coli 感受态细胞。</li> <li>b. 每组连接反应转化原液取 100 μl 用无菌玻棒均匀涂布于筛选培养基上, 37℃下培养半小时以上, 直至液体被完全吸收。</li> </ol> </li> </ol>