

TA 克隆常见问题分析

现象可能原因解决方案 转化后无菌落生长感受态细胞已经失效用 pUC18 质粒进行转化，确认细胞的感受态效率。1ng pUC18 质粒至少应得到 1000 个以上的转化子。如有问题，重新制备感受态细胞。平板所用抗性不对 pBS-T 载体为 amp 抗性，工作浓度 100 ug/ml 连接中使用了不恰当的 vector:insert 比例估计 PCR 产物的量，将 vector:insert 比例限制在 3:1 到 1:5 的范围内。对于极小的 PCR 产物进行克隆，很可能因为 PCR 产物严重过量，导致无菌落或菌落极少。白色克隆无插入片段可能反复冻融导致载体单个的 3'端突出的 T 已经降解试用其他批次的 T 载体。长期不用的载体请在-20℃保存，避免反复冻融载体。做自连对照检测 T 载体。如果自连长出大量菌落，请放弃载体。转化后只有白色克隆本载体加 T 及连接 PCR 产物效率非常高，对于一些质量很好的 PCR 产物，有可能转化后菌落全部为白斑平板上未涂 IPTG 或 X-Gal 如果平板上与空白对照相比，菌落数明显增加，则该情况很正常。绝大部分菌落为蓝色或淡蓝色，只有极少数的白斑有可能插入片段没有失活 lacZ 基因很小的插入片段 (<500bp) 不一定完全将 lacZ 基因失活，导致菌斑部分蓝色。如果平板长的菌落很多，而自连对照长的菌落很少，蓝色菌落中就包含有插入片段。挑选一些蓝色菌落提质粒进行酶切鉴定。正常大小的蓝色或白色菌落周围有一些很小的白色菌落这些小的白色克隆为 amp 敏感的卫星菌落，它们不包含质粒。不要挑取这些很小的白色菌落。确认 amp 的浓度，并且平板 37℃培养的时间不要过长。挑菌时不要挑取这些小的白色菌落。白色菌落在液体培养基中不长 白色菌落为 amp 敏感的卫星菌落确认挑选大的白色菌落，确认 amp 的有效性。