

EZ-Blunt Zero pTOPO Cloning Kit

EZ-Blunt 零背景 pTOPO 平末端克隆试剂盒

版本号: V190802

货号: T182-100
保存: -20°C
运输: 低温

货号	规格
T182-20	20 rxn
T182-100	100 rxn

【产品概述】

本产品采用拓扑异构酶 I (Topoisomerase I) 的连接原理, 不同于使用 T4 DNA 连接酶的传统克隆方法, 可在数分钟甚至数秒内高效连接 DNA 片段。有效连接片段长度可达 10 kb。此外, 本产品无自连、零背景, 无需蓝白斑筛选, 阳性克隆比例高, 极少出现空载体, 是简单、快速、零背景免筛选的 TOPO 平末端克隆载体。同时, 本产品提供 1 kb 的 DNA 片段 (1 kb Control) 作为连接反应的阳性对照。DNA 测序可采用 M13 Forward 和 M13 Reverse 通用型引物。

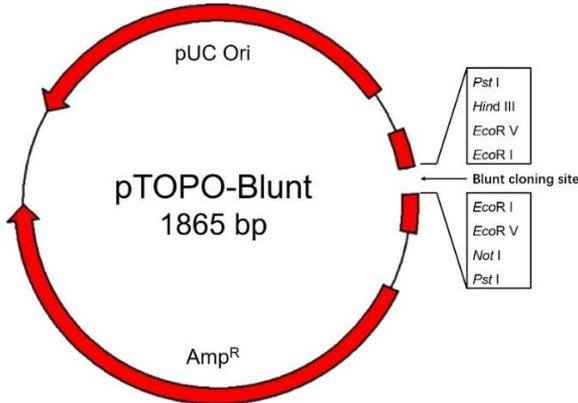
【产品组分】

组分	浓度	规格
pTOPO-Blunt Vector	30 ng/μl	20 μl × 5
1 kb Control	30 ng/μl	5 μl
10×Enhancer		20 μl × 5

【保存条件】

-20°C 恒温保存, 保质期 12 个月。

【pTOPO-Blunt 载体图谱和序列】



pTOPO-Blunt 载体通用测序引物序列:
M13F: TGTAACGACGGCCAGT
M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

图1. pTOPO-Blunt 载体环形图谱

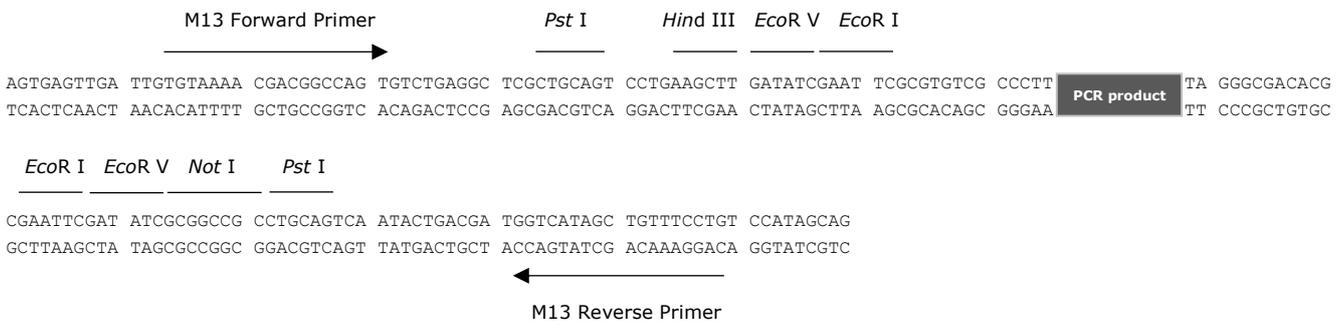


图2. pTOPO-Blunt 载体的多克隆位点区序列

【操作步骤】

1. 连接反应的准备：

PCR反应需使用非磷酸化引物，且扩增产物需为平末端（推荐使用GenStar的SuperStar Max或SuperStar Plus系列产品）。单一条带PCR产物（仅有目的条带、无非特异条带和引物二聚体）可直接进行连接反应，无需纯化，否则建议胶回收纯化后使用。如果是以质粒为模板的PCR产物则建议进行胶回收纯化，因为模板质粒也可能长出菌落（非目的载体）。

2. 连接反应：

1) 室温下，按下表配制反应体系。

组分	样品	阳性对照
纯化后的PCR产物	0.5-8 μ l	—
1 kb Control (30 ng/ μ l)	—	1 μ l
pTOPO-Blunt Vector (30 ng/ μ l)	1 μ l	1 μ l
10 \times Enhancer	1 μ l	1 μ l
Sterilized ddH ₂ O	补足至10 μ l	补足至10 μ l

用移液器轻轻吹打或轻弹管底混匀，低速瞬时离心至所有液体在离心管底。

注：注意此步骤在室温进行，不能在冰上进行。

不同大小插入片段的推荐用量：

插入片段大小	最佳用量
100-1000 bp	10-40 ng
1000-2000 bp	40-80 ng
2000-5000 bp	80-150 ng

2) 20-37°C连接5 min。

3) 连接产物可直接转化感受态细胞或贮存于-20°C。如尚未准备好感受态细胞，可以将连接产物短时间置于冰上备用。

3. 转化：以常规化学转化为例，具体方法请参考所使用感受态细胞的说明书；电转化需首先对连接反应液进行脱盐处理。

1) 将感受态细胞置于冰上融解。

2) 取适量连接反应液加入至感受态细胞中（连接反应液体积 \leq 10%感受态细胞体积），轻柔混匀，冰浴 10-30 min。

3) 42°C加热 45-60 s 后，冰浴 2 min，该过程不要摇动离心管。

4) 加入 800 μ l SOC 或 LB 培养基，37°C振荡培养 40-60 min。

注：一般商品化的感受态细胞，不超过2 kb插入片段情况下，10 min复苏即可得到足够多转化子；如遇插入片段长、转化子少的情况，建议延长复苏时间至45-60 min以得到更多的转化子。

5) 将菌液均匀涂布到含 100 μ g/ml 氨苄青霉素（Amp）的 LB 琼脂平板，37°C培养 12-16 h。

4. 转化子筛选鉴定：

1) 菌落/菌液PCR：可选用M13 Forward和M13 Reverse通用型引物或基因特异性引物进行菌落/菌液PCR扩增。推荐使用GenStar的2 \times Taq PCR StarMix (Cat# A012)。应尽可能设立阳性对照和阴性对照反应。

2) 酶切鉴定：挑取白色正常菌落，摇菌抽提质粒。插入片段较大的情况下，可直接电泳观察质粒大小即可鉴定出是否含有插入片段；也可用EcoR I/EcoR V单酶切释放插入片段或用其它合适的内切酶酶切，琼脂糖凝胶电泳检测片段大小，确定是否含有目的片段。

3) DNA测序：选用M13 Forward和M13 Reverse通用型引物进行测序鉴定。

【补充说明】

1. 连接反应如果使用5 μ l体系连接，各成分按照比例减半使用，使用次数可以加倍。

2. 本载体推荐20-37°C放置5 min完成连接，但多数情况下连接2-3 min已经可以得到足够多的转化子。

3. 转化时，感受态细胞可不经冰浴和热激，20-37°C放置5 min也可完成转化，但是转化效率会比冰浴和热激低。

4. 更多TA克隆相关技术资料请参考我公司网站<http://www.gene-star.com>或《康润生物产品目录》。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。