

# 产品说明书

26 版

## 基本信息

|       |                            |
|-------|----------------------------|
| 产品编号: | PS2434                     |
| 产品名称: | 零背景 pTOPO-TA/Blunt 通用克隆试剂盒 |

## 产品简介:

本产品传统的 T4 连接酶原理不同, 它利用了 Topoisomerase 可以在瞬间、高效连接 DNA 片段的原理及工艺制成, 可以在瞬间完成任意 PCR 产物 (兼容 A 末端/平末端) 连接。特制的新型载体质粒大小仅仅不到 2kb, 充分发挥了 TOPO 载体体积小, 可容纳片段越大的优势, 最大限度提高了大片段连接效率; 连接后质粒大小比传统载体小 2 kb 以上, 质粒越小, 转化效率越高, 极大的提高了各种片段连接后的转化子数量。采用氨苄抗性载体只需 10 分钟复苏时间, 比卡那抗性载体 1 小时复苏时间缩短 6 倍, 从连接到涂板最快只需 15-20 分钟。转化过程中可以不用冰浴和热休克, 最快室温 5 分钟内完成转化; 自杀基因零背景原理, 无自连假阳性。连接长片段能力远超传统 TA 克隆载体, 可连接长达 10kb 片段, 是新一代的简单、快速、零背景免筛选的 TOPO 克隆载体。

## 产品特点

|                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------|
| 1: 兼容性强、瞬间连接: 几秒钟-几分钟完成任意 PCR 产物 (兼容 A 末端/平末端) 连接。                          |
| 2: 质粒载体小、容载片段大、转化效率高: 新型载体质粒大小仅仅不到 2kb, 连接后质粒大小比传统载体小 2kb 以上, 质粒越小, 转化效率越高。 |
| 3: 转化快速、方便: 只需 10 分钟复苏时间, 最快可以不用冰浴和热休克, 室温 5 分钟内完成转化, 从连接到涂板最快只需 15-20 分钟。  |
| 4: 阳性率高: 采用自杀基因零背景原理, 无自连假阳性。                                               |

## 组分:

| 组分   | 组分名称                             | 规格 (20T)   | 规格 (50T)    | 保存条件  |
|------|----------------------------------|------------|-------------|-------|
| 组分 A | pTOPO-TA/Blunt Vector (30 ng/mL) | 40 $\mu$ l | 160 $\mu$ l | -20°C |
| 组分 B | 1000 bp Control (30 ng/mL)       | 5 $\mu$ l  | 5 $\mu$ l   | -20°C |
| 组分 C | 10 $\times$ Enhancer             | 20 $\mu$ l | 80 $\mu$ l  | -20°C |

## 操作步骤 (实验前请先阅读注意事项):

|                                                                               |               |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 一: 实验准备                                                                       |               |
| 1: PCR 引物使用正常设计的引物即可, 不需做任何改变 (不能用磷酸化引物)。任意 PCR 产物 (兼容 A 末端/平末端) 均可以直接连接。     |               |
| 2: PCR 产物一般建议胶回收纯化, 这样可以避免后续可能的问题。如果 PCR 产物仅有目的条带、无非特异条带和引物二聚体, 也可尝试直接进行连接反应。 |               |
| 3: 如果是质粒为模板的 PCR 产物则最好进行纯化, 因为模板质粒也可能长出菌落 (非目的载体)。                            |               |
| 二: 连接反应                                                                       |               |
| 1: 室温 (25°C-37°C) 按下表推荐设立 10 $\mu$ L 连接体系 (用 0.2mLPCR 管, PCR 仪器控温)            |               |
| 组分                                                                            | 体积            |
| 纯化后的 PCR 产物/或者 1 $\mu$ l 1000 bp control                                      | 0.5-5 $\mu$ L |





|                                                                                                                                                                                                   |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| pTOP0-TA/Blunt Vector                                                                                                                                                                             | 2 $\mu$ L  |
| 10 X Enhancer                                                                                                                                                                                     | 1 $\mu$ L  |
| 无水菌                                                                                                                                                                                               | X $\mu$ L  |
| 总体积                                                                                                                                                                                               | 10 $\mu$ L |
| 注意：如果使用 5 $\mu$ L 体系连接，各成分按照比例减半使用，使用次数可以加倍。                                                                                                                                                      |            |
| 不同大小插入片段的推荐用量（注意过量太多，反而导致转化子减少）：                                                                                                                                                                  |            |
| 插入片段大小（bp）                                                                                                                                                                                        | 推荐用量（ng）   |
| 100-1000                                                                                                                                                                                          | 10-40      |
| 1000-2000                                                                                                                                                                                         | 40-80      |
| 2000-5000                                                                                                                                                                                         | 80-180     |
| 各组分加完后，用移液器轻轻吹打混匀或者轻弹管底混匀，低速瞬时离心收集所有液体在离心管底，注意此步骤不能在冰上进行，只能在室温（25℃-37℃）进行。                                                                                                                        |            |
| 2：室温（25℃-37℃）连接 5 分钟（建议置于 PCR 仪器上控温）。<br>注意：本载体推荐室温（25℃-37℃）5 分钟完成连接。长片段或者连接困难片段可以延长连接时间到 10-15 分钟，温度可选 37℃，可显著增加转化子数量。                                                                           |            |
| 3：连接产物置于冰上备用。立即接标准的感受态转化步骤或者快速转化步骤。                                                                                                                                                               |            |
| 三：快速转化                                                                                                                                                                                            |            |
| 1：感受态细胞从-80℃拿出，迅速插入冰浴中，解冻融化（约 1-3 分钟左右）。                                                                                                                                                          |            |
| 2：立刻加入 5 $\mu$ L 连接液（最多可全部加入，只要体积不超过感受态细胞体积的 1/10），用手拨打离心管底轻轻混匀（避免用枪吸打），冰浴放置 5 分钟。                                                                                                                |            |
| 3：42℃水浴热激 60 秒，迅速放回冰浴静置 2-3 分钟，该过程不要摇动离心管。<br>注意：此步骤首选建议 42℃水浴 60 秒热激。大部分商品化的 TOP10 和 DH5a 感受态细胞此步骤也可将离心管置于室温（>22℃）进行，时间不需十分准确，夏季或室温较高时，可放置 5-8 分钟左右；如果室温较低，可延长至 8-15 分钟左右。有经验的客户可以根据具体情况尝试无热激转化。 |            |
| 4：加 500 $\mu$ LLB 或者 SOC 培养基（不含抗生素），37℃200rpm 振荡培养 10-20 分钟。<br>注意：一般可以直接将培养基（应事先置 37℃温箱回温至 22℃-37℃）加入到感受态细胞的 1.5mL 离心管，盖上离心管盖，水平固定在振荡培养箱中振荡培养复苏即可。                                               |            |
| 5：取 100-200 $\mu$ L 菌液涂板（培养板含氨苄青霉素 100 $\mu$ g/mL），培养过夜。<br>注意：如果预计转化子少，为得到较多克隆，4000rpm 离心 1min，吸弃掉部分上清，保留 100 $\mu$ L，轻弹悬浮菌体，取全部菌液涂板。                                                            |            |
| 四：转化子的筛选鉴定                                                                                                                                                                                        |            |
| 1：本产品 TOP0 载体阳性率非常高，所以菌落生长正常，数量正常的情况下建议省略菌落 PCR/菌液 PCR 鉴定直接去测序。<br>注意：测序引物不能采用 M13(-47)/M13(-48)通用引物测序。                                                                                           |            |
| 2：TOP0 载体的菌落 PCR 结果容易出现假阴性。因此在使用菌落 PCR 鉴定的情况下，如菌落 PCR 结果阳性，一般可以相信此结果。如结果是阴性，或者显示扩增出大小和预期不符合，一般不可相信，要考虑到菌落 PCR 结果假阴性的可能。需要进一步提取质粒电泳跑大小，或者酶切鉴定来确认。                                                  |            |
| 3：用上述培养的白色菌落的菌液抽提质粒，插入片段较大的情况下，直接跑电泳看质粒大小就直接能鉴定出有插入的质粒，还可用 EcoR I/EcoR V 单酶切释放插入片段或用其它合适的酶切，琼脂糖凝胶电泳检查片段大小，确定是否含有目的片段。                                                                             |            |

## 注意事项：



- 1: 冰袋运输，室外常温放置 1-2 天不影响质量。
- 2: 避免试剂长时间置于室温，避免反复冻融。
- 3: 测序只能采用 M13F/M13R 通用引物测序（见附录部分图谱），但是不能采用 M13(-47)/M13(-48) 通用引物测序。菌落 PCR 可使用和测序相同的引物。
- 4: 为了您的安全和健康，实验时请穿实验服并戴一次性手套操作。

**储存:** 低温运输, -20℃保存, 12 个月。

附:

