

版本号:160320

Zero Background pTOPO-Blunt Cloning Kit**零背景 pTOPO-Blunt 平末端克隆试剂盒**

目录号: CV16

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	20 次(CV1601)	80 次(CV1602)
pTOPO-Blunt Vector(30ng/μl)	20 μl	80 μl
1 kb Control (40ng/μl)	5 μl	5 μl
10 × Enhancer	20 μl	80 μl

-20℃ 储存, 至少 12 个月内不影响使用效果。

❖ 产品介绍:

本制品和传统的T4连接酶原理不同, 它利用了Topoisomerase可以在瞬间(几秒钟-几分钟)、高效(接近100%)连接DNA片段的原理采用本公司独创的工艺制成。

1. 可以在瞬间(几秒钟-几分钟)完成连接。
2. 无需冰浴和热休克, 室温5分钟内完成转化; 无需1小时复苏, 只需37℃10分钟复苏便可以涂板。从连接到涂板只需15-20分钟。
3. 无自连、零背景, 无需繁琐蓝白斑筛选, 见到长出的克隆便是有插入的(接近100%)。
4. 可以连接长达10kb片段(即使连接5kb片段, 挑10个菌落, 至少8个是有插入的), 是目前世界上最简单、最快速、零背景免筛选的TOPO Blunt平末端克隆载体。

测序可以采用 M13F/M13R 通用引物测序(见后面图谱)

❖ 操作步骤:

1. 连接反应的准备:

PCR引物不能磷酸化。使用扩增产物是平末端的高保真聚合酶系列扩增(如Pfu、Vent、Phusion DNA Polymerase)。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(货号: DR01)。如果是以质粒为模板的PCR产物则最好进行纯化, 因为模板质粒也可能长出菌落(但不是想构建的目的载体)。

2. 连接反应:

- 1) 室温 (20°C-30°C) 按照如下体系操作 (10μl 体系):

纯化后的 PCR 产物/或者 1μl 1kb control	0.5-8μl
pTOPO-Blunt Vector	1μl
10 × Enhancer	1μl
灭菌水	Xμl
<hr/>	
总体积	10μl

加完试剂后, 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 (20°C-30°C) 进行。**

注: 如果使用 5μl 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:

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

- 2) 室温 (20°C-30°C) 连接 5 分钟。

本载体推荐室温 5 分钟完成连接, 但在很多情况下连接 2-3 分钟已经可以得到足够多的转化子。

- 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:

- 1) 50-100μl 感受态细胞, 置于室温解冻, 完全解冻后 (约 1 分钟左右) 轻弹几次将细胞均匀悬浮。

- 2) 加入 5μl 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), 轻轻混匀, 室温放置 5 分钟。

根据我们的经验, 本公司载体使用商品化的感受态细胞不需要冰浴和热休克、室温放置 5 分钟便可获得足够多转化子, 如果实验室自制感受态细胞或者效率较低时, 可以按照标准程序进行。

- 3) 加 300-500μl LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素), 37°C 180 rpm 振荡培养 10 分钟。**根据我们的经验, 一般可以直接将培养基 (事先平衡至室温) 加入感受态细胞的 1.5 ml 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, 不需要转移到试管培养复苏。**

一般商品化的感受态细胞不超过 2kb 插入片段情况下, 10 分钟复苏可以得到足够

多转化子，如果使用实验室自制的感受态或者插入片段长转化子少的情况下可以提高复苏时间到 30-60 分钟以得到更多的转化子。

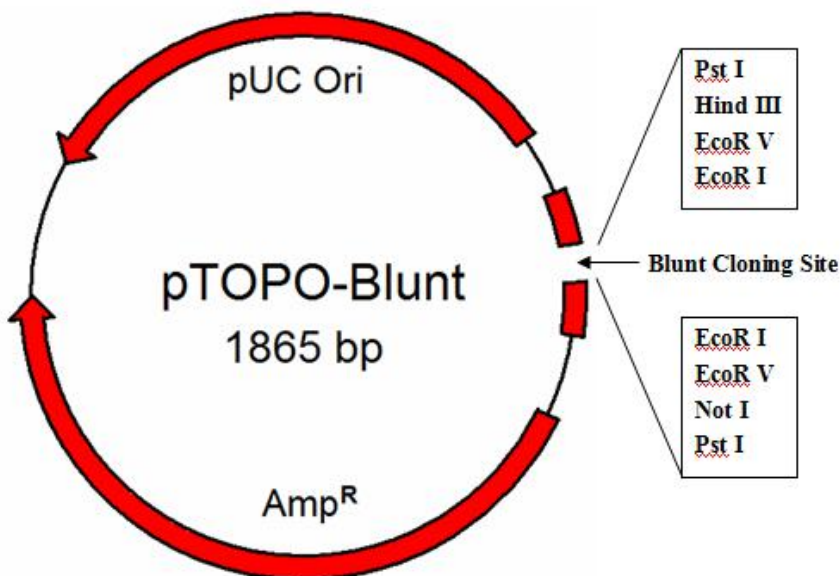
- 4) 取 200 μ l 菌液涂板(含氨苄青霉素 50-100 μ g/ml)，培养过夜（如果预计转化子少，为得到较多克隆，4000 rpm 离心 1 min，吸弃掉部分上清，保留 100-150 μ l，轻弹悬浮菌体，取全部菌液涂板）

4. 转化子的筛选鉴定：

本制品阳性率相当高，一般情况下，可以达到所见即所得，只要是长出来的菌落正常（不是污染的杂菌，转化子数量也不算太少），基本就包含插入。因此插入片段不超过 2-3kb 的情况下可以不用鉴定直接挑 1-2 个菌去测序，。

- 1). 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 双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。
- 2). 挑取菌落直接进行 PCR 检测（可参见分子克隆第 3 版本或者咨询我们）。
- 3). 用通用 M13F/M13R 引物测序来确定是否含有目的克隆。

❖ pTOPO-Blunt 载体图谱：



❖ pTOPO-Blunt 载体通用测序引物序列：

M13F: TGTA AACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

❖ pTOPO-Blunt 载体多克隆位点序列:

