

## 零背景 pTOPO-Blunt Simple 平末端克隆试剂盒

### KM604-1 20次

#### 试剂组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KM604
pTOPO-Blunt Vector (30ng/μl)	-20°C	20ul
1000bp Control (30ng/μl)	-20°C	5ul
10 × Enhancer	-20°C	20μl

本试剂盒在-20°C储存, 有效期为一年。

#### 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. 平末端PCR产物不需要先加A, 在瞬间(几秒钟-几分钟)完成**平末端PCR产物连接**。
2. 特制的新型载体质粒大小仅仅不到2kb, 充分发挥了TOPO载体越小, 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2kb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。
3. 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。
4. 最快可以不用冰浴和热休克, 室温5分钟内完成转化; 无需1小时复苏, 只需37°C 10分钟复苏便可以涂板。从连接到涂板最快只需15-20分钟。
5. 自杀基因零背景原理, 无自连假阳性, 无需繁琐蓝白斑筛选和菌落PCR筛选。大部分情况下随机挑一个克隆便是有插入的(接近100%)。
6. 连接长片段能力远超传统Blunt克隆载体, 可连接长达10kb片段(例如连接5kb片段, 也可能达到挑10个菌落, 至少8个是有插入的效果), 是新一代世界领先的简单、快速、零背景免筛选的TOPO Blunt平末端克隆载体。

注意: Simple注意: 测序只能采用 M13F/M13R通用引物测序(见后面图谱), 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。

## 操作步骤:

连接反应的准备:

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)。使用扩增产物是平末端的高保真聚合酶系列扩增(如sPfu、Phusion、kod Mix) 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。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)。

1. 连接反应: 室温(25°C-37°C) 设立 10 $\mu$ l 连接体系(建议用 0.2ml PCR 管, PCR 仪器控温):

纯化后的PCR产物/或者1 $\mu$ l 1000bp control	0.5-5 $\mu$ l
pTOPO-Blunt Simple Vector	1 $\mu$ l
10 $\times$ Enhancer	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O to final volume	10 $\mu$ l

**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(25°C-37°C) 进行。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。**

2. 不同大小插入片段的推荐用量(注意过量太多了, 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

3. 室温(25°C-37°C) 连接 5 分钟(建议置 PCR 仪器上控温)。

**本载体推荐室温(25°C-37°C) 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°C, 可显著增加转化子数量。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。

#### 4. 快速转化:

- a. 感受态细胞从 -80°C 拿出, 迅速插入冰浴中, 解冻融化 (约 1-3 分钟左右)。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。
- b. 42°C 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。

**注意: 此步骤首选建议 42°C 水浴 60 秒热激。但是根据我们的经验, 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°C) 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。**

- c. 加 500 $\mu$ l LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素), 37°C 200 rpm 振荡培养 10-20 分钟。

**建议可以直接将培养基 (如从冰箱取出温度低, 应事先置 37°C 温箱回温至 22°C-37°C) 加入到感受态细胞的 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, 热休克后 10-15 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效率低、或者转化子少、插入片段长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。**

- d. 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。(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 $\mu$ l, 轻弹悬浮菌体, 取全部菌液涂板)

#### 5. 转化子的筛选鉴定:

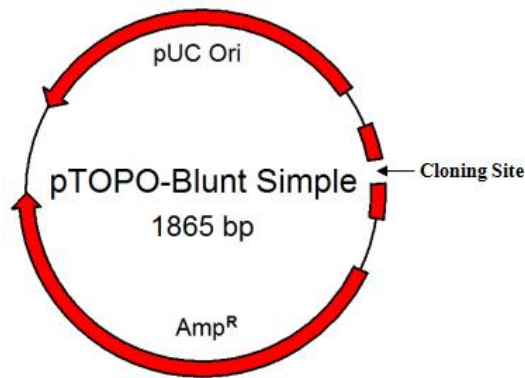
**本制品采用自杀基因零背景原理, 无插入自连的细菌会自杀无法生长, 因此几乎没有假阳性, 一般情况下, 可以达到所见即所得, 只要是长出来的菌落正常 (不是污染的杂菌, 转化子数量也不算太少), 基本就包含插入。因此插入片段不超过 2-3kb 的情况下可以不用菌落 PCR 鉴定, 直接挑 1-2 个菌去测序。**

- a. 一般 TOPO 载体阳性率非常高, 所以菌落生长正常, 数量也不是太少的情况下建议省略菌落 PCR/菌液 PCR 鉴定直接去测序。**注意测序引物不能采用 M13(-47)/M13(-48)通用引物测序。**
- b. TOPO 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。

- c. 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。

pTOPO-Blunt Simple 载体图谱：



pTOPO-Blunt Simple 载体

通用 M13 测序引物序列：

M13F: TGTAACGACGGCCAGT      M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

注：“M13 通用引物”有多种不同的序列，且个别引物合成公司默认的 M13 引物与此载体所用的 M13 序列有差异，合成使用前务必先核对序列。

pTOPO-Blunt Simple 载体多克隆位点序列：

