版本号:190605

Zero Background pTOPO-TA/Blunt Simple Cloning Kit
零背景 pTOPO-TA/Blunt Simple 通用克隆试剂盒

目录号：CV22

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	20 次(CV2201)	80 次(CV2202)
pTOPO-TA/Blunt Simple Vector(30ng/μl)	40 μl	160 μl
1000bp Control（30ng/μl）	5 μl	5 μl
10 × Enhancer	20 μl	80 μl

－20℃储存，至少 12 个月。冰袋运输，1-2 天置于室外常温不影响质量。

❖ 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**任意PCR产物（兼容A末端/平末端）**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℃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TA/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 TA/Blunt克隆载体。

本制品在克隆插入位点两侧不含多克隆酶切位点（Simple），需要时可在 PCR 扩增引物上导入合适的酶切位点。此时如果使用 PCR 扩增引物导入的酶切位点进行酶切时，酶切反应将不会受到载体上其它多克隆酶切位点影响，可大大提高酶切效率，增加亚克隆成功率。

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：**

1. 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）。任意PCR产物（兼容A末端/平末端）均可以直接连接。PCR产物一般建议胶回收纯化（货号：DR01），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）。

2. 连接反应：

1) 室温（25℃-37℃）设立 10μl 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 1μl 1000bp control	0.5-5μl
pTOPO-TA/Blunt Simple Vector	2μl
10 × Enhancer	1μl
灭菌水	Xμl
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（25℃-37℃）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（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

2) 室温（25℃-37℃）连接 5 分钟（建议置 PCR 仪器上控温）。

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。

3. 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 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)，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。

注意：此步骤首选建议 42℃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℃）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，可延长时间至 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 500μl LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素)，37℃ 200 rpm 振荡培养 10-20 分钟。

根据我们的经验，一般可以直接将培养基（如从冰箱取出温度低，应事先置 37℃温箱回温至 22℃-37℃） 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。

5) 取 100-200μl 菌液涂板(培养板含氨苄青霉素 100μg/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 100μl，轻弹悬浮菌体，取全部菌液涂板）

4. 转化子的筛选鉴定：

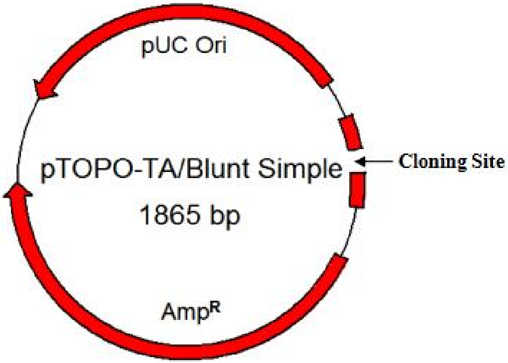
本制品采用自杀基因零背景原理，无插入自连的细菌会自杀无法生长，因此几乎没有假阳性，一般情况下，可以达到所见即所得，只要是长出来的菌落正常（不是污染的杂菌，转化子数量也不算太少），基本就包含插入。因此插入片段不超过 2-3kb 的情况下可以不用菌落 PCR 鉴定,直接挑 1-2 个菌去测序。

1). 一般本公司 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。**

2). 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。

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，还可用载体骨架上酶切位点如 ApaI/BglI/BsaHI，或者插入片段上引入的酶切位点酶切鉴定，琼脂糖凝胶电泳检查片段大小，确定是否含有目的片段。

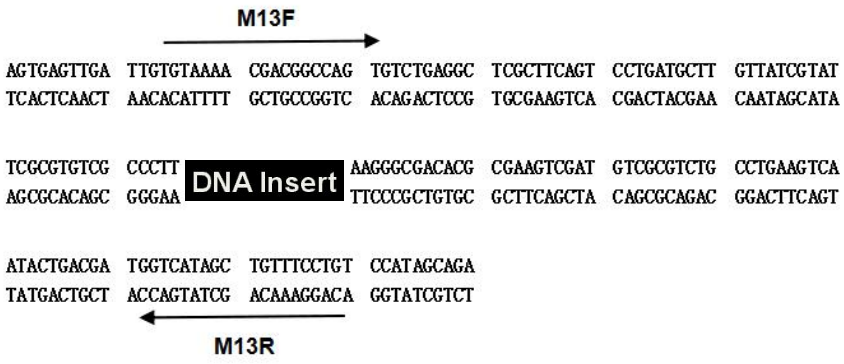
❖ **pTOPO-TA/Blunt Simple 载体图谱：**



pTOPO-TA/Blunt Simple 载体通用 M13 测序引物序列：

M13F:TGTAAAACGACGGCCAGT

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-TA/Blunt Simple 载体克隆位点序列：**