



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

版本号:2019-06-17

ZTOPO-Blunt/TA零背景快速克隆试剂盒

ZTOPO-Blunt/TA Zero Background Fast Cloning Kit

(目录号: ZC211) 含多克隆酶切位点

· 通用 · 快速 · 简单 · 高效 · 连接片段长

- 克隆阳性率>95%
- 连接反应仅需 5 分钟
- 载体具有氨苄青霉素抗性
- 适用于平末端 PCR 产物和带 A 尾的 PCR 产物
- 载体采用了新的制备工艺, 零背景, 无需蓝白斑筛选
- 克隆位点两旁都有 SmaI 和 EcoRV 酶切位点, 适合单酶切鉴定

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

■ 试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	20次(ZC211-1)	60次(ZC211-2)
ZTOPO-B/T Vector (20ng/μl)	10μl	3×10μl
877bp Control (TA 50ng/μl)	5μl	5μl
10 × TOPO Buffer	10μl	3×10μl
1×菌落PCR MasterMix (M13引物)	1ml	3×1ml

保存：-20°C至少保存12个月。

注：ZTOPO-B/T Vector含有指示染料，粉红色或黄色均属正常，不影响使用。

■ 产品介绍

本试剂盒是利用拓扑异构酶I(Topoisomerase I)的切割再连接的原理，将片段克隆到载体中；此外，添加有去A酶，使得本载体对带A尾或平末端的PCR产物都可连接，并且连接效率无差异。即适用于克隆由Pfu、KOD、Phusion和Q5等高保真DNA聚合酶扩增的平末端PCR产物，也可克隆由Taq、Taqplus、Tth和klenTaq等DNA聚合酶扩增的带A尾的PCR产物。可以用引物M13F和M13R进行菌落PCR鉴定阳性克隆。

■ 操作步骤

1. 连接反应的准备：

1) PCR产物制备：（原则上所有PCR产物都可以）

① 引物要求：引物不能磷酸化。

② 酶的选择：Taq、Taqplus、Tth、klenTaq等Taq系列 或 Pfu、KOD、Phusion、Q5等高保真系列的DNA聚合酶。

2) 纯度

推荐使用琼脂糖凝胶电泳切胶纯化回收目的片段（建议长波紫外光下切胶或者可见光透射切胶，避免DNA损伤造成连接失败）。本公司的小量琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒或小量DNA产物纯化试剂盒可以对70bp以上的DNA片段有很好的回收效果。

3) 总量与浓度

在通常状况下，没有必要对插入片段进行精确定量，一般载体与插入片段的摩尔比优化至1:1~1:10 就可以得到良好结果。推荐载体与片段摩尔比控制在1:3~1:7之间。

不同大小插入片段的推荐加入量：(5μl反应体系中的用量)

插入片段大小 (bp)	推荐用量 (ng)	片段纯化后浓度 (ng/μl)
100-1000	10-50	>5
1000-2000	50-100	>10
2000-5000	100-200	>15

2. 连接反应: (5 μ l反应体系)

1) 室温 (20°C-30°C) 按照如下体系操作:

纯化后的带"A"末端或平末端DNA/或者1 μ l 877bp control	0.5-4 μ l
ZTOPO-B/T Vector	0.5 μ l
10 \times TOPO Buffer	0.5 μ l
灭菌水	X μ l
Final Volume	5 μ 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。

2) 室温 (20°C-30°C) 连接5-15分钟。

本载体推荐室温5分钟完成连接 (不要超过30分钟)。

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: (具体请按所购买感受态说明书操作)

1) 将连接液加入50 μ l 感受态中轻轻混匀。冰上放置30分钟。

2) 42°C水浴热激60秒,冰上放置2~3分钟,其间不能摇动离心管。

3) 加250-500 μ l LB或者SOC培养基(不含抗生素),37°C 180rpm振荡培养30-60分钟。

4) 将150-250 μ l 细菌涂布在氨苄青霉素(100 μ g/ml)平板上。倒置平板,37°C培养12-16h过夜。(如须得到更多的克隆,可4000rpm,1min。保留100-200 μ l上清,轻弹悬浮菌体,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4kb的情况下可以不用鉴定直接挑1-2个菌去测序。

1) PCR方法鉴定阳性克隆

(1) 挑选白色单克隆至10 μ l无菌水中,涡漩混合。

(2) 取1 μ l混合于20 μ l 菌落PCR MasterMix体系中进行阳性克隆鉴定。

(3) 菌落PCR

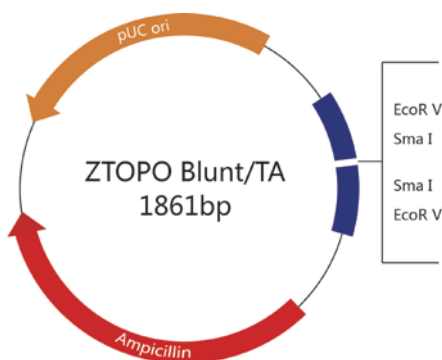
94°C 10min
 94°C 30sec
 55°C 30sec } 30 cycles
 72°C x min*
 72°C 5-10min

*根据片段大小确定延伸时间。扩增能力4kb/min。

2) 挑斑摇菌，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Sma I/EcoRV单酶切释放插入片段或用其他合适的酶切，琼脂糖凝胶电泳检查片段大小，确定是否含有目的片段。

3) 用通用M13F/M13R引物测序来确定是否含有目的克隆。

■ ZTOPO-Blunt/TA载体图谱



■ ZTOPO-Blunt/TA载体测序引物序列

M13F: TGTA AACGACGGCCAGT

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。

■ ZTOPO-Blunt/TA载体多克隆位点序列

