



Order:010-62617225 62979301  
Email:zomanbio@126.com  
Http://www.zomanbio.com

版本号:2020-07-14

# One step ZTOPO-Blunt/TA零背景快速克隆试剂盒

## One step ZTOPO-Blunt/TA Zero Background Fast Cloning Kit

(目录号: ZC206) 含多克隆酶切位点

· 高效 · 简便 · 快速 · 连接片段长

- 阳性 > 95 % 支持盲筛;
- 加入Mix和样品 5分钟完成连接;
- 适用粘/平双末端连接, 长达10kb
- 含有 EcoR1 EcoRV适用单酶切鉴定

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(ZC206-1)	60次(ZC206-2)
5×ZTOPO Mix (15ng/μl)	40μl	3×40μl
877bp Control (10ng/μl)	5μl	5μl
1×菌落PCR MasterMix (M13引物)	1ml	3×1ml

保存：-20℃至少保存8个月，4℃可短时间保存（不超过30天）。

## ■ 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。

1. 无需繁琐蓝白斑筛选，阳性克隆率>95%
2. 操作简单,仅需加入5×ZTOPO Mix和样品,5分钟完成连接；
3. 适用于平末端 PCR 产物和带 A 尾的 PCR 产物；
4. 可以连接长达10kb片段（对6kb以内片段，有超过90%的阳性率）
5. 克隆位点两旁都有 EcoR I 和 EcoR V 酶切位点，适合单酶切鉴定
6. 本载体使用Topo异构酶进行连接，酶切片段需去磷酸化。

## ■ 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1:1~1:3之间。

与T4 ligase的载体相比，本载体的插入片段用量更低，且并不是插入片段越多转化越多，例如：某2Kb插入片段，30ng转化1000个菌落，120ng转化200个菌落。

不同大小插入片段的推荐加入量: (10 $\mu$ l反应体系中的用量)

插入片段大小 (bp)	推荐用量 (ng)
100-1000	10-40
1000-2000	30-60
2000-5000	40-100
5000-10000	80-200

## 2. 连接反应: (10 $\mu$ l反应体系)

1) 室温 (20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C) 按照如下体系操作:

纯化的PCR产物/或者1 $\mu$ l 877bp control	1-8 $\mu$ l
5 $\times$ ZTOPO Mix	2 $\mu$ l
灭菌水	X $\mu$ l
Final Volume	10 $\mu$ l

5 $\mu$ l反应体系亦可, 各试剂用量减半。

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 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C) 连接5分钟。

本载体推荐室温5分钟完成连接, 对于5kb以上片段, 可适当增加连接时间 (不要超过30分钟), 但在很多情况下连接1-2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 $^{\circ}$ 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 $\mu$ l 感受态中轻轻混匀。冰上放置30分钟。

2) 42 $^{\circ}$ 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 $\mu$ l LB或者SOC培养基(不含抗生素), 37 $^{\circ}$ C 180rpm振荡培养30-60分钟。

4) 将50-250 $\mu$ l 细菌涂布在氨苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)平板上。倒置平板, 37 $^{\circ}$ C培养12-16h过夜。(如须得到更多的克隆, 可4000rpm, 1min。保留100-200 $\mu$ 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5kb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 $\mu$ l无菌水中, 涡漩混合。

(2) 取1 $\mu$ l混合于20 $\mu$ l 菌落PCR MasterMix\*<sup>1</sup>体系中进行阳性克隆鉴定。

(3) 菌落PCR

- 94°C 10min
  - 94°C 30sec
  - 55°C 30sec
  - 72°C x min\*2
- } 30 cycles
- 72°C 5-10min

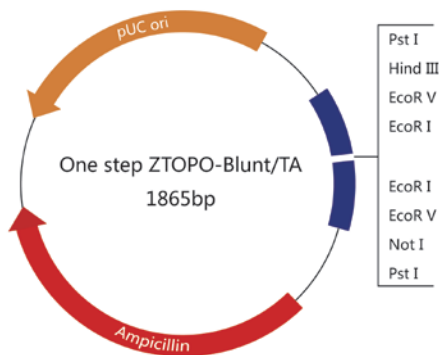
注：\*1 本PCR Master Mix不适用于高GC片段鉴定。

\*2 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EcoR I/EcoR V双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。

■ One step ZTOPO-Blunt/TA载体图谱



■ One step ZTOPO-Blunt/TA 载体测序引物序列

M13F: TGTA AACACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAACAGCTATGACC

注1：“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。

注2：个别常用酶切位点说明

PstI 9、HindIII 624、Sca I 2475

注3：载体全序列请详见公司官网

■ One step ZTOPO-Blunt/TA载体多克隆位点序列

