



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本: 2025/08/19

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
Catalog # ZC206

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

储存条件: -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。即适用于克隆由庄盟K5(ZT211)、Pfu和KOD等高保真DNA聚合酶扩增的平末端PCR产物, 也可克隆由庄盟F5(ZT213)、Taq、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. 氨苄青霉素抗性基因去除 BsaI 位点, 便于后续 Golden Gate 或CRISPR/Cas9实验
7. 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: 庄盟F5(ZT213)、Taq、Tth、klenTaq等Taq系列或庄盟K5(ZT211)、Pfu和KOD等高保真系列的DNA聚合酶。

2) 纯化

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: (10μl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: (10μl反应体系)

1) 室温 (20℃-37℃) 按照如下体系操作:

纯化的PCR产物/或者1μl 877bp control	1-8μl
5×ZTOPO Mix	2μl
灭菌水	Xμl
Final Volume	10μl

5μl反应体系亦可, 各试剂用量减半。

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.



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-37°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°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50μl 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250-500μl 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50-250μl 细菌涂布在氨苄青霉素(100μg/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100-200μl上清,轻弹悬浮菌体,涂板)。

4. 转化子的筛选鉴定:

1) PCR方法鉴定阳性克隆

(1) 挑选白色单克隆至10μl无菌水中,涡旋混合。

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

(3) 菌落PCR

94°C 2 min

94°C 15 sec

55°C 15 sec

72°C 15 s/kb

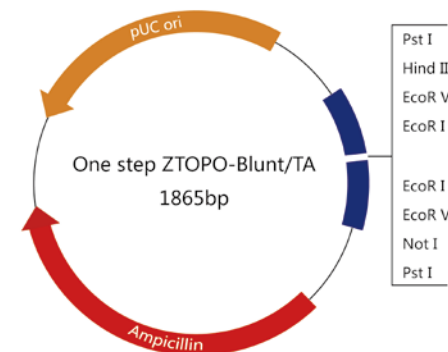
30 cycles

72°C 5-10 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: TGTAAACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

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

Pst I 9、Hind III 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

