



EZ-TA/Blunt 零背景 pTOPO II 克隆试剂盒

E1372025

产品描述

本产品采用拓扑异构酶 I (Topoisomerase I) 的连接原理, 不同于使用 T4 DNA 连接酶的传统克隆方法, 可在数分钟甚至数秒内高效连接 DNA 片段, 可兼容 TA 克隆与平末端克隆。有效连接片段长度可达 10 kb。此外, 本产品无自连、零背景, 无需蓝白斑筛选, 阳性克隆比例高, 极少出现空载体, 是简单、快速、零背景免筛选的 TOPO 通用型克隆试剂盒。载体上具有氨苄青霉素 (Amp) 和卡那青霉素 (Kan) 双抗性, 有助于减少卫星菌落, 便于后续挑取阳性克隆。试剂盒中提供 800 bp 的 DNA 片段 (Control Insert) 作为连接反应的阳性对照, 同时提供 M13 F/R Primer Mix 通用型引物用于菌落 PCR 鉴定。

产品特点

1. 兼容范围: 适用于连接平末端和带 3'-A 的 PCR 产物。
2. 快速反应: 连接反应仅需 5 min。
3. 阳性率高: 载体具有氨苄青霉素和卡那青霉素双抗性。
4. 简单高效: 无自连、零背景, 无需蓝白斑筛选。

稳定性和储存

-20°C 保存, 保质期 12 个月。

产品组分表

Component	20 T	100 T	Storage
pTOPO-TA/Blunt Vector (40 ng/μl)	20 μl	100 μl	-20°C.Avoid freeze/thaw cycle.
10×Enhancer	20 μl	100 μl	-20°C.Avoid freeze/thaw cycle.
Control Insert (800 bp 20 ng/μl)	5 μl	5 μl	-20°C.Avoid freeze/thaw cycle.
M13 F/R Primer Mix (10 μM)	200 μl	500 μl	-20°C.Avoid freeze/thaw cycle.

操作步骤

1. 连接反应的准备:

PCR 反应需使用非磷酸化引物。扩增产物可为平末端或携带 3'-末端 A 碱基。

注 1: PCR 产物, 特别是以质粒为模板的 PCR 产物, 推荐进行胶回收纯化后使用, 因为模板质粒也可能长出菌落(非目的载体)。

注 2: 酶切产物或其它带磷酸化末端的片段, 需要进行去磷酸化处理后再进行连接反应。

2. 连接反应：

1) 室温下，按下表配制反应体系。

注：此步骤在室温进行，不能在冰上进行

组分	样品	阳性对照
纯化后的 PCR 产物	0.5-8 μ l	—
Control Insert (800 bp 20 ng/ μ l)	—	1 μ l
pTOPO TA/Blunt Vector (40ng/ μ l)	1 μ l	1 μ l
10 \times Enhancer	1 μ l	1 μ l
Sterile Water	补足至 10 μ l ^a	补足至 10 μ l ^a

用移液器轻轻吹打或轻弹管底混匀，低速瞬时离心至所有液体在离心管底。

^a 如果使用 5 μ l 体系连接，各成分按照比例减半使用。为提高加样准确性，尽量使用正常体系操作。

不同大小插入片段的推荐用量：

插入片段大小	最佳用量
100-1000 bp	10-40 ng
1000-2000 bp	40-80 ng
2000-5000 bp	80-150 ng

2) 20-37°C 连接 5 min。

注：本载体推荐 20-37°C 放置 5 min 完成连接，但多数情况下连接 2-3 min 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。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：以常规化学转化为例，具体方法请参考所使用感受态细胞的说明书；电转化需首先对连接反应液进行脱盐处理。

1) 将感受态细胞置于冰上融解。

2) 取适量连接反应液加入至感受态细胞中（连接反应液体积 \leq 10% 感受态细胞体积），轻柔混匀，冰浴 10-30 min。

3) 42°C 加热 45-60 s 后，冰浴 2 min，该过程不要摇动离心管。

4) 加入 800 μ l SOC 或 LB 培养基，37°C 振荡培养 40-60 min。

5) 将菌液均匀涂布到含 100 μ g/ml 氨苄青霉素 (Amp) 或者 50 μ g/ml 卡那青霉素 (Kan) 的 LB 琼脂平板，37°C 培养 12-16 h。

4. 转化子筛选鉴定：

1) 菌落/菌液 PCR：可选用 M13 F/R Primer Mix 或基因特异性引物进行菌落/菌液 PCR 扩增。应尽可能设立阳性对照和阴性对照反应。

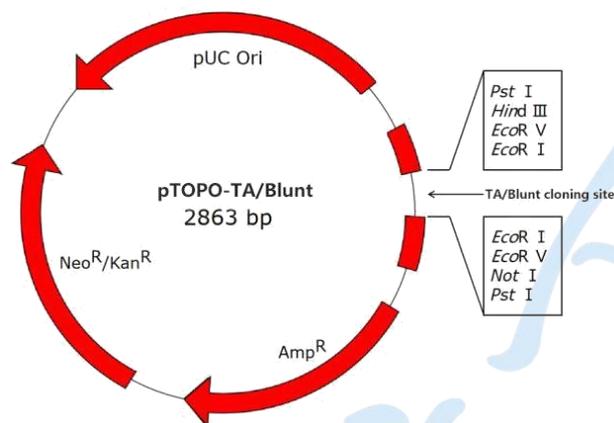
2) 酶切鉴定：挑取白色正常菌落，摇菌抽提质粒。插入片段较大的情况下，可直接电泳观察质粒大小即可鉴定出是否含有插入片段；也可用 EcoR I/EcoR V 单酶切释放插入片段或用

其它合适的内切酶酶切，琼脂糖凝胶电泳检测片段大小，确定是否含有目的片段。

3)DNA 测序：选用 M13 Forward 和 M13 Reverse 通用型引物进行测序鉴定。

补充说明

1.pTOPO TA/Blunt 载体环形图谱



pTOPO TA/Blunt 载体通用测序引物序列：

M13F: TGTA AACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

2.pTOPO TA/Blunt 载体序列

黄底为插入位点两侧序列，红底和绿底之间为插入位点

```

1  ctggaagtg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttgta tctgcgctct
61  gctgaagcca gttacctcg aaaaagagtt ggtagctctt gatccgcaa acaaccacc
121 gctggtagcg gtggttttt tgttgcaag cagcagatta cgcgagaaa aaaaggatct
181 caagaagatc ctttgatttt ctaccgaaga aaggcccacc cgtgaagggtg agccagtgag
241 ttgatttgtt aaaacgacgg ccagtgctcg aggctcgtc cagtcctgaa gcttgatac
301 gaattcgcgt gtgc ccctta agggcgacac gcgaattcga tatcgcggcc gctgcagtc
361 aatactgacg atggatcatag ctgttctctg tccatagcag aaagtcaaaa gcctccgacc
421 ggaggctttt gacttgatcg gcacgtaaga ggtccaact taccataa tgaataaga
481 tcactaccgg gcgtattttt tgagtatcag agatttcag gagctaagga agctaaaatg
541 agtattcaac attccggtg cgccttatt ccttttttg cggcatttg cttcctgtt
601 tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtcacga
661 gtgggttaca tcgaactgga tccaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa
721 gaacgtttc caatgatgag cacttttaa gttctgctat tgggcgcggt attatcccgt
781 attgacgccg ggcaagagca actcggctgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt
841 gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc
901 agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcgccaact tacttctgac aacgatcgga
961 ggaccgaagg agctaaccgc tttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat
1021 cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct
1081 gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac ttagcttcc
1141 cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg
    
```

1201 gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag cgggtgagcg tggctcacgc
 1261 ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg
 1321 acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca
 1381 ctgattaagc attgtaatc tggaaggtt gggaagccct gcaaagtaaa ctggatggct
 1441 ttctgccgc caaggatctg atggcgcagg ggatcaagct ctgatcaaga gacaggatga
 1501 ggatcgtttc gcatgattga acaagatgga ttgcacgcag gttctccggc cgcttgggtg

3.pTOPO TA/Blunt 载体的多克隆位点区序列

