

天
净
沙
系
列

CAT#:160684-25A
CAT#:160684-50A
CAT#:160684-25K
CAT#:160684-50K
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

SuperTOPO 平末端克隆试剂盒

SuperTOPO Blunt Cloning Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506
网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>本产品是基于 Topoisomerase 能够在几秒钟之内高速连接 DNA 片段的原理开发的无背景克隆试剂盒，它使用了本公司通过定点突变改良的 TOPO 酶，连接效率比野生型更高。本试剂盒具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 高效快速，连接反应几乎在几秒钟内完成，连接率几乎达到 100%。 2. 适用于 <i>pfu</i>、KOD 等高保真聚合酶扩增的平末端片段的克隆。 3. 无杂带或引物二聚体的 PCR 扩增产物可以不经纯化直接用于连接反应。 4. 零背景，无需 IPTG-X-Gal 蓝白斑筛选，故不需要 IPTG-X-Gal 培养基。 5. 本试剂盒按 10 uL 标准反应体系，有 25 次和 50 次两种规格包装供选择。 6. 提供含 Amp 和 Kan 两种抗性的载体供选择（160684-25A/50A 是含 Amp 抗性 TOPO 载体，160684-25K/50K 是含 Kan 抗性 TOPO 载体）。 																																			
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="438 777 1404 1406"> <thead> <tr> <th>成 份</th> <th>编 号</th> <th>25 次热封袋包装</th> <th>50 次热封袋包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SuperTOPO-Amp Blunt 载体</td> <td>160684-A</td> <td>25 uL (其一)</td> <td>50 uL (其一)</td> </tr> <tr> <td>SuperTOPO-Kan Blunt 载体</td> <td>160684-K</td> <td>25 uL (其一)</td> <td>50 uL (其一)</td> </tr> <tr> <td>连接缓冲液</td> <td>160684B</td> <td>25 uL</td> <td>50 uL</td> </tr> <tr> <td>M13F 引物</td> <td></td> <td>50 uL</td> <td>50 uL</td> </tr> <tr> <td>M13R 引物</td> <td></td> <td>50 uL</td> <td>50 uL</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>100935</td> <td>1 mL</td> <td>1 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td colspan="3">1 份</td> </tr> </tbody> </table> <p>注意：160684-25A/50A 提供 SuperTOPO-Amp Blunt 载体， 160684-25K/50K 提供 SuperTOPO-Kan Blunt 载体。</p>				成 份	编 号	25 次热封袋包装	50 次热封袋包装	SuperTOPO-Amp Blunt 载体	160684-A	25 uL (其一)	50 uL (其一)	SuperTOPO-Kan Blunt 载体	160684-K	25 uL (其一)	50 uL (其一)	连接缓冲液	160684B	25 uL	50 uL	M13F 引物		50 uL	50 uL	M13R 引物		50 uL	50 uL	超纯水	100935	1 mL	1 mL	使用手册	1 份		
成 份	编 号	25 次热封袋包装	50 次热封袋包装																																	
SuperTOPO-Amp Blunt 载体	160684-A	25 uL (其一)	50 uL (其一)																																	
SuperTOPO-Kan Blunt 载体	160684-K	25 uL (其一)	50 uL (其一)																																	
连接缓冲液	160684B	25 uL	50 uL																																	
M13F 引物		50 uL	50 uL																																	
M13R 引物		50 uL	50 uL																																	
超纯水	100935	1 mL	1 mL																																	
使用手册	1 份																																			
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存，有效期一年。</p>																																			
<p>自备试剂</p>	<p>DNA 插入片段、感受态细胞、SOB 或 LB 培养基（含抗菌素和不含的）</p>																																			
<p>使用方法</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 如果是 PCR 制备插入片段，所用引物不能磷酸化，使用 <i>pfu</i>、KOD 等产生平末端片段的高保真 DNA 聚合酶。为保证扩增产物的完整性，PCR 循环结束后，再延伸 5-10 分钟，确保片段延伸完全。 2. 电泳检测并相对定量 PCR 片段（跟 DNA marker 比较）。根据插入片段长度和下表确定每次连接反应需要的最佳用量： <table border="1" data-bbox="702 2011 1145 2132"> <thead> <tr> <th>插入片段长度</th> <th>最佳用量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>100-1000 bp</td> <td>20-50 ng</td> </tr> </tbody> </table> 				插入片段长度	最佳用量	100-1000 bp	20-50 ng																												
插入片段长度	最佳用量																																			
100-1000 bp	20-50 ng																																			

1000-2000 bp	50-100 ng
2000-5000 bp	100-200 ng

3. 在一个干净的塑料离心管中，室温下（**不要放在冰上**）设置如下连接反应体系：

成份	用量
纯化后的 PCR 产物	不超过 8 uL（详见注意事项）
SuperTOPO-Amp Blunt 载体或 SuperTOPO-Kan Blunt 载体	1 uL
连接缓冲液	1 uL
超纯水	补到 10uL

注意：如果使用未经纯化的 PCR 产物，则需要加入量不能超过 1 uL，否则 PCR 体系会干扰连接体系。

4. 轻柔吹打混匀后，短暂离心，常温（20-30℃）放置 0-5 分钟。如果在冬天室温低于 20℃，建议使用 25℃水浴或金属浴。注意：连接时间超过 5 分钟的话连接效率会降低。
5. 如果当天不转化，可以将离心管放-20℃保存。如果转化，则取 5 uL 连接液加到 50-100 uL 刚刚融化的感受态细胞中，轻柔混匀。注意：本产品要求感受态细胞的转化效率不得低于 5×10^7 cfu/ug。
6. 如果片段长度小于 2 Kb，则不需要冰浴和热激，直接在离心管中加入 500 uL 不含抗菌素的 SOC 或 LB 培养基，然后取 200 uL 涂盘。也可以先 3000g 离心 2 分钟后，弃掉大部分上清，只留约 100 uL 左右，然后重悬细菌后全部涂盘在含 Amp（对 SuperTOPO-Amp）或 Kan（对 SuperTOPO-Kan）的培养皿上，37℃过夜培养。
7. 如果片段长度长于 2 Kb，则按常规转化方式，先冰浴 2-30 分钟，然后 42℃热激 30 秒，冰上防放置 2 分钟，再在离心管中加入 500 uL 不含抗菌素的 SOC 或 LB 培养基，37℃ 250 rpm 培养 60 分钟，然后取 200 uL 涂盘。也可以先 3000g 离心 2 分钟后，弃掉大部分上清，只留约 100 uL 左右，然后重悬细菌后全部涂盘在含 Amp（对 SuperTOPO-Amp Blunt 载体）或 Kan（对 SuperTOPO-Kan Blunt 载体）的培养皿上，37℃过夜培养。
8. 用 M13F/M13R 通用引物进行菌落 PCR 或直接测序来鉴定重组子。

技术资料

该载体的多克隆位点序列:

```

          M13F
          |-----|
AGTGAGTTGA TTGTGTA AAA CGACGGCCAG TGTCTGAGGC TCGCTGCA GT CCTGAGCTT GATATCGAAT
TCACTCAACT AACACATTTT GCTGCCGGTC ACAGACTCCG AGCGACGTC A GGACTTCGA CTAAGCTTA

TCGCGTGTCG CCCTT
TCGCACAGC GGGAA
EcoRI EcoRV NotI PstI
CGAATTCGAT ATCGCGCCG CCTGCACTCA ATACTGACGA TGGTCATAGC TGTTTCCTGT CCATAGCAG
GCTTAACTA TAGCGCCGGT GACGTCAGT TATGACTGCT ACCAGTATCG ACAAAGGACA GGTATCGTC
          M13R

```

通用测序引物序列:

M13F	TGTA AAACGACGGCCAGT
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC

关联产品

SuperTOPO 通用克隆试剂盒 (CAT#:160685)、SuperTOPO TA 克隆试剂盒 (CAT#:160686)