



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

版本号:2018-12-17

# ZTOPO-TA零背景快速克隆试剂盒

## ZTOPO-TA Zero Background Fast Cloning Kit

(目录号: ZC206) 含多克隆酶切位点

· 快速 · 简单 · 高效 · 连接片段长

- 无自连, 无需繁琐蓝白斑筛选, 阳性克隆率接近100%
- 使用Topoisomerase可在5min内完成连接
- 可以连接长达10kb片段  
(对6kb以内片段, 有超过90%的阳性率)
- 本载体带有T粘性末端, 特别适合Taq酶扩增产物的克隆

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)
ZTOPO-T Vector (30ng/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8个月。

## ■ 产品介绍

本试剂盒是专门针对带有“3'-A末端”的DNA片段TA克隆试剂盒。产品使用TOPO异构酶和先进的自杀基因筛选技术（无需繁琐蓝白斑筛选），可极快且高效连接DNA片段，阳性率高。

1. 无自连，无需繁琐蓝白斑筛选，阳性克隆率接近100%；
2. 使用Topoisomerase可在5min内完成连接；
3. 可以连接长达10kb片段（对6kb以内片段，有超过90%的阳性率）；
4. 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：带“A”末端的PCR产物

- ① 引物要求：引物不能磷酸化。
- ② 酶的选择：Taq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 $\mu$ 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DNA/或者1 $\mu$ l 877bp control	0.5-4 $\mu$ l
ZTOPO-T Vector	0.5 $\mu$ l
10 $\times$ TOPO Buffer	0.5 $\mu$ l
灭菌水	X $\mu$ l
Final Volume	5 $\mu$ 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分钟。

本载体推荐室温5分钟完成连接(不要超过20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50 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ l 细菌涂布在氨苄青霉素(100 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

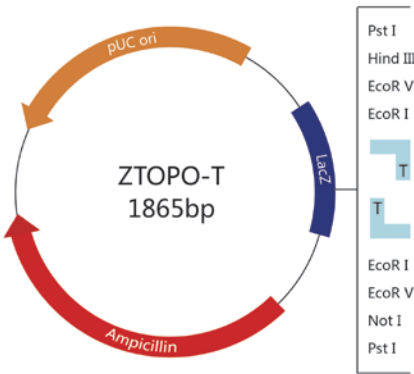
(3) 菌落PCR

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

■ ZTOPO-T载体图谱



■ ZTOPO-T载体测序引物序列

M13F: TGTAACGACGGCCAGT  
 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、HindIII 624、Sca I 2475

注3: 载体全序列请详见公司官网

■ ZTOPO-T载体多克隆位点序列

