



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

版本号:2024-11-5

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 % ;
- 加入Mix和样品 5分钟完成连接;
- 适用粘/平双末端连接, 长达10 kb;
- 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°C至少保存8个月，4°C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. 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片段有很好地回收效果。

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 μ 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 μ l反应体系)

1) 室温 (20 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C) 按照如下体系操作：

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

5 μ 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-37 $^{\circ}$ 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 μ 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 μ 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 μ l 细菌涂布在氨苄青霉素(100 μ 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 μ l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10 μ l无菌水中，涡漩混合。

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

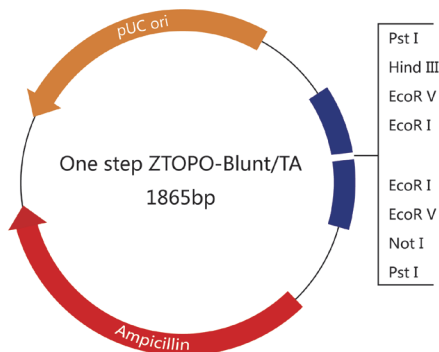
(3) 菌落PCR

- 94°C 2 min
 - 94°C 15 sec
 - 55°C 15 sec
 - 72°C 15 s/kb
 - 72°C 5-10 min
- } 30 cycles

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 AACGACGGCCAGT

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

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

	M13F		PstI	HindIII	EcoRV	EcoRI	
AGTGAGTTGA	TTGTGTA AAA	CGACGGCCAGT	TGCTGAGGC	TCGCTGCAGT	CCTGAAGCTT	GATATC GAAT	
TCACTCAACT	AACACATTTT	GCTGCCGGTC	ACAGACTCCG	AGGCAGCTCA	GGACTTCGAA	CTATAG CTTA	
TCGCGTGTGC	CCCTT	DNA Insert				AA GGGCGACAG	TT CCCGCTGTGC
AGCGCACAGC	GGGAA	EcoRI	EcoRV	NotI	PstI		
CGAATTCGAT	ATCGCGGCCG	CGTGCACTCA	ATACTGACGA	TGGTCATAGC	TGTTTCCTGT	CCATAGCAG	
GCTTAAGCTA	TAGCGCCGGC	GGACGTCAGT	TATGACTGCT	ACCAAGTATCG	ACAAAGGACA	GGTATCGTC	
				M13R			