

M5 HiPer pTOPO-TA Simple Cloning Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer pTOPO-TA Simple Cloning Kit	20T	MF020-01
M5 HiPer pTOPO-TA Simple Cloning Kit	4×20T	MF020-04

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 12 个月。使用后请及时放入-20°C 保存以保证酶的活性。

【产品简介】

本制品和传统的 T4 连接酶原理不同，它利用了 Topoisomerase 可以在瞬间（几秒钟-几分钟）、高效（接近 100%）连接 DNA 片段的原理采用本公司独创的工艺制成。本制品在克隆插入位点两侧不含多克隆酶切位点，需要在 PCR 扩增引物上导入合适的酶切位点。此时如果使用 PCR 扩增引物导入的酶切位点进行 DNA 酶切时，酶切反应将不会受到 T 载体上其它多克隆酶切位点上的限制酶影响，可以大大提高酶切效率，增加亚克隆成功率。

【产品特点】

1. 可以在瞬间（几秒钟-几分钟）完成连接。
2. 无需冰浴和热休克，室温 5 分钟内完成转化；无需 1 小时复苏，只需 37°C 10 分钟复苏便可以涂板。从连接到涂板只需 15-20 分钟。
3. 无自连、零背景，无需繁琐蓝白斑筛选，见到长出的克隆便是有插入的（接近 100%）。
4. 可以连接长达 10kb 片段。
5. **测序可以采用 M13F/M13R 通用引物测序**（见后面图谱）

【产品组份】

	20T	4x20T
M5 Hiper pTOPO-TA Simple Vector (30ng/μl)	20μl	80μl
1000bp Control (30ng/μl)	5μl	5μl
10x Enhancer	20μl	80μl

【操作步骤】

1. 连接反应的准备:

<注意: PCR 引物不能磷酸化>。使用能在 PCR 产物末端加一个突出的 3' -A 的酶系列扩增（如 Taq、TaqHiFi、Tth、AmpliTaq、KlenTaq DNA Polymerase）。PCR 产物（仅有目的条带、无非特异条带和引物二聚体）可直接进行连接反应，无需纯化；如果有非特异扩增，建议胶回收纯化（货号：MF029）。如果是以质粒为模板的 PCR 产物，也必须进行切胶纯化，因为模板质粒也可能长出菌落（但不是想构建的目的载体）。

2. 连接反应:

1) 室温（20°C -30°C）下建立如下体系（10μl 体系）:

纯化后的 PCR 产物/或者 1μl 1000bp control	0.5-8μl
M5 Hiper pTOPO-TA Simple Vector	1μl
10x Enhancer	1μl
灭菌水补齐到	10μl

<注意: 如果使用 5μl 体系，各成分按照比例减半，使用次数可以加倍>。

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。

<注意此步骤不能在冰上进行，只能在室温（20°C-30°C）进行>。

不同大小插入片段的推荐用量:

插入片段大小 (bp)	最佳用量 (ng)
100-1000	20-50
1000-2000	50-100
2000-5000	100-200

- 2) 室温 (20°C -30°C) 连接 5 分钟。<推荐室温 5 分钟完成连接, 但在很多情况下连接 2-3 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:

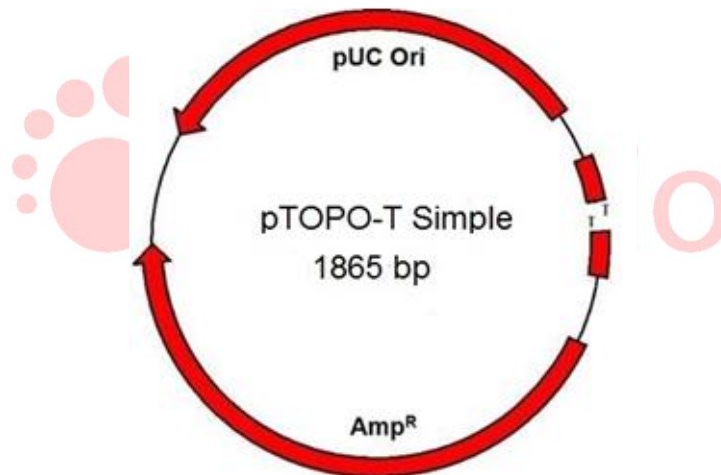
- 1) 50-100μl 感受态细胞, 置于室温解冻, 完全解冻后 (约 1 分钟左右) 轻弹几次将细胞均匀悬浮。
- 2) 加入 5μl 连接液(最多可全部加入, 只要体积不超过感受态细胞体积的 1/10), 轻轻混匀, 室温放置 5 分钟。
<根据以往数据, 本公司载体使用商品化的感受态细胞不需要冰浴和热休克、室温放置 5 分钟便可获得足够多转化子, 如果实验室自制感受态细胞或者效率较低时, 可以按照标准程序进行>。
- 3) 加 300-500μl LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素), 37°C 180 rpm 振荡培养 10 分钟。
<根据以往数据, 一般可以直接将培养基 (事先平衡至室温) 加入感受态细胞的 1.5 ml 离心管, 盖上离心管盖, 水平固定在振荡培养箱中振荡培养复苏即可, 不需要转移到试管培养复苏>。
<一般商品化的感受态细胞不超过 2kb 插入片段情况下, 10 分钟复苏可以得到足够多转化子, 如果使用实验室自制的感受态或者插入片段长转化子少的情况下可以提高复苏时间到 30-60 分钟以得到更多的转化子>。
- 4) 取 200μl 菌液涂板(含氨苄青霉素 50-100μg/ml), 培养过夜 (如果预计转化子少, 为得到较多克隆, 4000 rpm 离心 1 min, 吸弃掉部分上清, 保留 100-150μl, 轻弹悬浮菌体, 取全部菌液涂板)

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 2-3kb 的情况下可以不用鉴定直接挑 1-2 个菌去测序。

- 1) 用上述培养的白色菌落的菌液抽提质粒, 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 EcoRI/EcoRV 双酶切释放插入片段或用其它合适的酶切, 琼脂糖凝胶电泳检查片段大小, 确定是否含有目的片段。
- 2) 挑取菌落直接进行 PCR 检测 (可参见分子克隆第 3 版本或者咨询我们)。
- 3) 用通用 M13F/M13R 引物测序来确定是否含有目的克隆。

【M5 HiPer pTOPO-TA Simple 载体图***】



【M5 HiPer pTOPO-TA Simple 载体通用测序引物序列】

M13F: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'

M13R: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'

【M5 HiPer pTOPO-TA Simple 载体克隆位点序列】

M13F						
AGTGAGTTGA	TTGTGTA AAA	CGACGGCCAG	TGCTGAGGC	TCGCTTCAGT	CCTGATGCTT	GTTATCGTAT
TCACTCAACT	AACACATTTT	GCTGCCGGTC	ACAGACTCCG	AGCGAAGTCA	GGACTACGAA	CAATAGCATA
TCGCGTGTCTG	CCCTT	DNA Insert			AA	GGGCGACACG
AGCGCACAGC	GGGA				TT	CCCCTGTGCT
CGAAGTCGAT	GTCGCGTCTG	CCTGAAGTCA	ATACTGACGA	TGGTCATAGC	TGTTTCCTGT	CCATAGCAGA
GCTTCAGCTA	CAGCGCAGAC	GGACTTCAGT	TATGACTGCT	ACCGATATCG	ACAAAGGACA	GGTATCGTCT
M13R						

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。