

# M5 HiPer One-minute pTOPO-TA/Blunt Cloning Kit

## 末端通用克隆载体使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer One-minute pTOPO-TA/Blunt Cloning Kit	20T	MF888-01
M5 HiPer One-minute pTOPO-TA/Blunt Cloning Kit	4x20T	MF888-04

**【储存条件】** -20°C

### 【产品简介】

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。

### 【产品组份】

	20T	4x20T
pTOPO-TA/Blunt Vector (40 ng/μl)	20 μl	80 μl
10×Enhancer	20 μl	80 μl
Control Insert (800 bp 20 ng/μl)	5 μl	5 μl
M13 F/R Primer Mix (10 μM)	200 μl	400 μl

### 【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。

**注意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)。

**注意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。**注意: 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 μl	—
Control Insert (800 bp 20 ng/μl)	—	1 μl
pTOPO TA/Blunt Vector (40ng/μl)	1 μl	1 μl
10×Enhancer	1 μl	1 μl
Sterile Water	补足至10 μl*	补足至10 μl*

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。

\*如果使用5 μl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

- 20-37°C连接5 min。本载体推荐20-37°C放置5 min完成连接，但多数情况下连接1-2 min已经可以得到足够多的转化子。
- 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。

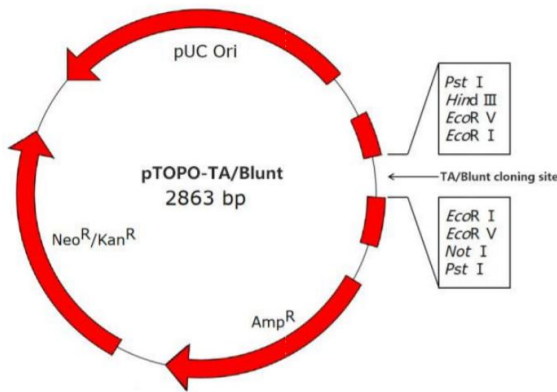
- 将感受态细胞置于冰上融解。取适量连接反应液加入至感受态细胞中（连接反应液体积≤10%感受态细胞体积），轻柔混匀，冰浴10-30 min。42°C加热45-60 s后，冰浴2 min，该过程不要摇动离心管。
- 加入800 μl SOC或LB培养基，37°C振荡培养40-60 min。将菌液均匀涂布到含100 μg/ml氨苄青霉素（Amp）或者50 μg/ml卡那霉素（Kan）的LB琼脂平板，37°C培养12-16 h。

**4. 转化子筛选鉴定：**

- 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。推荐使用聚合美的光速mix（M002plus）。应尽可能设立阳性对照和阴性对照反应。
- 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。
- DNA测序：选用M13 Forward和M13 Reverse通用型引物进行测序鉴定。

**【载体图谱】**

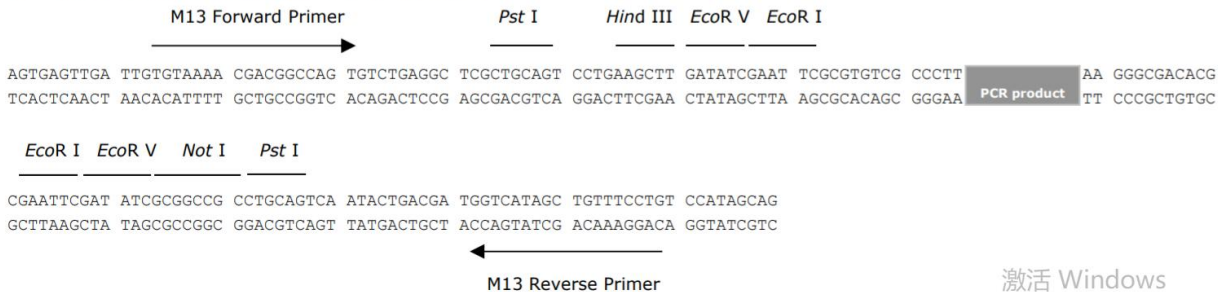
1. pTOPO TA/Blunt 载体环形图谱



pTOPO TA/Blunt载体通用测序引物序列：

M13F: TGTA AACGACGGCCAGT  
M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

2. pTOPO TA/Blunt载体的多克隆位点区序列



激活 Windows

**【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。