Hieff Clone® Zero TOPO-Blunt Cloning Kit

零背景 TOPO-Blunt 平末端克隆试剂盒

Cat No. 10909

产品说明书

本产品仅作科研用途！

产品信息

产品名称	产品编号	规格	价格（元）
Hieff Clone® Zero TOPO-Blunt Cloning Kit 零背景 TOPO-Blunt 平末端克隆试剂盒	10909ES20	20 T	625.00

产品描述

本试剂盒是利用拓扑异构酶（Topoisomerase）高效快速连接 DNA 片段的原理进一步研发而成，与传统的 T4 连接酶相比，具有以下优势：1）快速，仅需 1-5 分钟即可完成连接反应。2）高效，无自连现象，阳性克隆率接近 100%，无需设置蓝白斑筛选；3）操作简单，从连接到涂板仅需 15-20 min。操作过程省去冰浴、热激和 1 h 复苏。4）可连接长达 5 kb 目的产物。

产品用途

平末端 PCR 产物的快速克隆。
克隆后 PCR 产物的快速测序（使用 M13F/M13R 引物）。

产品组分

组分编号	组分名称	产品货号（规格）
		10909ES20（20 T）
10909-A	pESI-Blunt vector (30 ng/μL)	20 μL
10909-B	1 kb control insert (40 ng/μL)	5 μL
10909-C	10×Enhancer	20 μL

运输和保存方法

冰袋运输。-20℃保存，避免反复冻融。有效期一年。

注意事项

为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用方法

一、Control DNA 片段的克隆实验

1）在无菌微量离心管中配制下列 DNA 溶液，以 10 μL 为例。

组分	用量
10 × Enhancer	1 μL
1 kb control insert (40 ng/μL)	1 μL
pESI-Blunt vector (30 ng/μL)	1 μL
ddH_2O	7 μL

2）混匀上述体系。于室温（20-30℃）反应 5 min。

【注】：连接反应不可于冰上进行。反应时间不要超过 5 min，一般 1-2 min 即可完成连接反应，得到足够的重组子。

3）连接产物可直接转化或于-20℃保存。

4）全量 10 μL 加入 100 μL 感受态细胞，轻轻混匀，室温放置 5 min。

【注】：a）也可取 5 μL 连接液，加入 50 μL 感受态细胞中（加入体积不超过感受态细胞体积的 1/10)。

b）通常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 min 便可获得足够多转化子，如果感受态细胞效率较低时，可以按照冰浴热激的标准程序进行。

5）加 300-500 μL LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素)，37℃ 180 rpm 振荡培养 10 min。

6）取 200 μL 菌液涂板（含氨苄抗性的 LB 或 SOC 固体培养基），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 μL，轻弹悬浮菌体，取全部菌液涂板）。

二、 一般 DNA 片段的克隆实验

所插入片段为平末端产物，利用高保真酶（如 Canace 高保真酶，Yeasen Cat#10135）扩增得到的产物如无非特异性条带、引物二聚体可直接进行连接反应。

否则建议胶回收后使用。

【注】：a、PCR 产物不能磷酸化。

b、如扩增模板为质粒，模板质粒会在后续实验中引起假阳性，因此推荐 PCR 产物进行胶回收后连接。

1）按照下表配制连接体系（以 10μL 为例）

组分	用量
10 × Enhancer	1 μL
pESI-Blunt vector (30 ng/μL)	1 μL
插入片段	0.5-8 μL
ddH_2O	To 10 μL

【注】：a）可根据具体实验情况按照上述比例调整反应体系。

b）不同的插入片段所用量参考下表：

插入片段大小	推荐用量
0.1-1 kb	20-50 ng
1-2 kb	50-100 ng
2-5 kb	100-200 ng

2）混匀上述体系。于室温（20-30℃）反应 5 min。

【注】：连接反应不可于冰上进行。反应时间不要超过 5min，一般 1-2min 即可完成连接反应，得到足够的重组子。

3）全量 10 μL 加入 100 μL 感受态细胞，轻轻混匀，室温放置 5 min。

【注】：a）也可取 5 μL 连接液，加入 50 μL 感受态细胞中（加入体积不超过感受态细胞体积的 1/10)。

b）通常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 min 便可获得足够多转化子，如果感受态细胞效率较低时，可以按照冰浴热激的标准程序进行。

4）加 300-500 μL LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素)，37℃ 180 rpm 振荡培养 10 min。

【注】：通常商品化的感受态细胞不超过 2 kb 插入片段情况下，10 min 复苏可以得到足够多转化子，如果感受态效率低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 min 以得到更多的转化子。

5） 取 200 μL 菌液涂板（含氨苄抗性的 LB 或 SOC 固体培养基），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 μL，轻弹悬浮菌体，取全部菌液涂板）。

6）转化子的筛选鉴定

a）菌落/菌液 PCR 鉴定；

b）质粒大小鉴定：挑取单克隆，抽提质粒后可根据质粒大小进行鉴定。

c）酶切鉴定：根据克隆实验设计，选择合适的限制性内切酶进行鉴定。

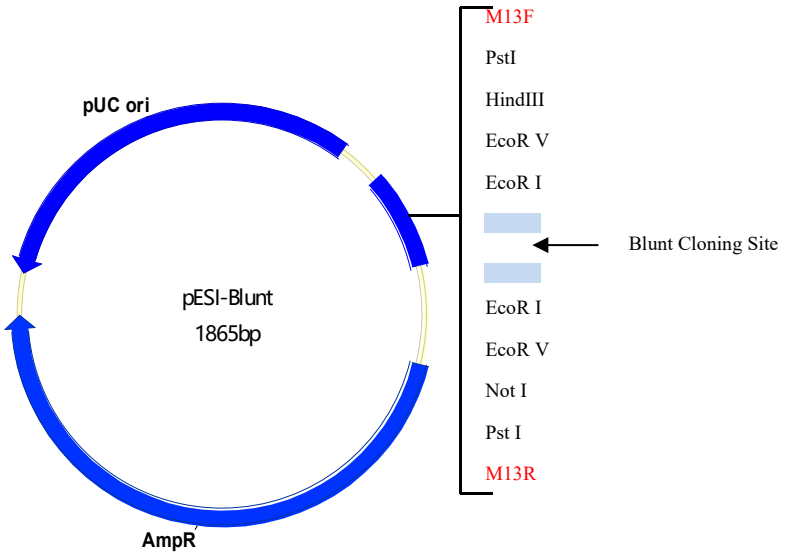
d) 测序分析：可选测序引物序列如下：

M13F：TGTAAAACGACGGCCAGT

M13R：CAGGAAACAGCTATGACC

【注】：本制品阳性率相当高，一般情况下，阳性克隆率接近 100%，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），基本就是阳性克隆，因此插入片段不超过 2-3 kb 的情况下可以不用鉴定直接挑 1-2 个菌去测序。

pESI-blunt vector 图谱



M13 Forward primer　　PstI

CTACCGAAGAAAGGCCCACCCGTGAAGGTGAGCCAGTGAGTTGATTGTGTAAAACGACGGCCAGTGTCTGAGGCTCGCTGCAGTCCTG

GATGGCTTCTTTCCGGGTGGGCACTTCCACTCGGTCACTCAACTAACACATTTTGCTGCCGGTCACAGACTCCGAGCGACGTCAGGAC

HindIII　EcoRV　EcoRI　　EcoRI　EcoR V　NotI　PstI

AAGCTTGATATCGAATTCGCGTGTCGCCCTT 插入片段 AAGGGCGACACGCGAATTCGATATCGCGGCCGCCTGCAG

TTCGAACTATAGCTTAAGCGCACAGCGGGAA 插入片段 TTCCCGCTGTGCGCTTAAGCTATAGCGCCGGCGGACGTC

M13 Reverse primer

TCAATACTGACGATGGTCATAGCTGTTTCCTGTCCATAGCAGAAAGTCAAAAGCCTCCGACCGGAGGCTTTTGACTTGATCG

AGTTATGACTGCTACCAGTATCGACAAAGGACAGGTATCGTCTTTCAGTTTTCGGAGGCTGGCCTCCGAAAACTGAACTAGC

pESI-blunt vector sequence

```
ORIGIN
        1 cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct
       61 gctgaagcca gttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc
```

```
 121 gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct
 181 caagaagatc ctttgatttt ctaccgaaga aaggcccacc cgtgaaggtg agccagtgag
 241 ttgattgtgt aaaacgacgg ccagtgtctg aggctcgctg cagtcctgaa gcttgatatc
 301 gaattcgcgt gtcgccctta agggcgacac gcgaattcga tatcgcggcc gcctgcagtc
 361 aatactgacg atggtcatag ctgtttcctg tccatagcag aaagtcaaaa gcctccgacc
 421 ggaggctttt gacttgatcg gcacgtaaga ggttccaact ttcaccataa tgaaataaga
 481 tcactaccgg gcgtattttt tgagttatcg agattttcag gagctaagga agctaaaatg
 541 agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt
 601 tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga
 661 gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa
 721 gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt
 781 attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt
 841 gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc
 901 agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga
 961 ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat
1021 cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct
1081 gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc
1141 cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg
1201 gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc
1261 ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg
1321 acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca
1381 ctgattaagc attggtaatg agggcccaaa tgtaatcacc tggctcacct tcgggtgggc
1441 ctttctgcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat
1501 cgatgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc
1561 cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc
1621 gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt
1681 tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccgt tcagcccgac
1741 cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg
1801 ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca
1861 gagtt
```

//

【注】：黄底为多克隆酶切位点序列

相关产品

产品名称	货号	规格	促销价（元）
Hieff Clone® Zero TOPO-TA Cloning Kit 零背景 TOPO-TA 克隆试剂盒 HOT	10907ES20	20 T	625
Hieff Clone® Zero TOPO-TA Simple Cloning Kit, MCS-Depleted 零背景 TOPO-TA 克隆试剂盒（不含 MCS 多克隆酶切位点）	10908ES20	20 T	625
Hieff Clone® Zero TOPO-Blunt Simple Cloning Kit 零背景 TOPO-Blunt 平末端克隆试剂盒（不含 MCS 多克隆酶切位点）	10910ES20	20 T	625
2×Hieff® PCR Master Mix (With Dye) HOT	10102ES03/08	1/5×1 mL	40/150
2×Hieff® Robust PCR Master Mix（With Dye) HOT	10106ES03/08	1/5×1 mL	65/265
Hieff Canace® Gold High-Fidelity DNA Polymerase 高保真 DNA 聚合酶 HOT	10148ES60/76	100/500 U	683/2383

HB190514