V1.0.0.202406CN

pTOPO001 Blunt Simple Cloning Kit

目录号

TC602

产品组成

组分	规格（20 次）
pTOPO001 Blunt Simple Vector (30 ng/μL)	20 μL
Control Template (1000 bp, 30 ng/μL)*	5 μL
10×Topo Buffer	20 μL

*阳性对照片段，用于对照组实验，检测插入片段的质量。

保存条件

-20℃保存 12 个月。

产品简介

本产品是基于拓扑异构酶（Topoisomerase）能够快速高效连接 DNA 片段的原理，结合本公司独特生产工艺制成的一款快速平末端克隆试剂盒，可高效替代基于 T4 连接酶的传统克隆。

产品中包含的 pTOPO001 Blunt Simple Vector 在插入位点两侧不含多克隆酶切位点，可有效连接 10 kb 以内 DNA 片段，并利用自杀基因零背景技术，解决了载体自连造成的假阳性困扰，无需繁琐的蓝白斑筛选操作，阳性率高达 95%。

产品特点

- ✧ 快速连接：5 min 内完成连接反应；
- ✧ 长短片段均适用：可连接 10 kb 以内 DNA 片段；
- ✧ 低背景：利用自杀基因零背景技术，可见即有插入，阳性率高达 95%。

适用范围

本产品适用于 10 kb 以内 DNA 片段的平末端克隆。

注意事项

1. 目的片段的 PCR 引物不能磷酸化；
2. PCR 产物建议进行胶回收纯化（目录号：GE706-200），避免非特异性扩增和引物二聚体的影响。纯化后，对回收产物进行琼脂糖凝胶电泳确定产物浓度；
3. 连接反应不能在冰上进行，请严格按照说明书推荐温度进行；
4. 请勿使用耐受 *ccd*B 自杀基因的感受态转化，推荐使用常规的 DH5α或 TOP10 感受态；
5. 测序时使用引物：M13F (TGTAAAACGACGGCCAGT) 和 M13R (CAGGAAACAGCTATGACC)，请勿使用引物 M13F（-47）/M13R（-48）。

使用方法

操作示例

1. PCR 产物的准备

1) 引物要求：引物不能磷酸化；
2) 产物末端：产物为平末端；
3) 产物纯化：对 PCR 产物进行凝胶回收纯化（目录号：GE706），电泳检测回收产物浓度后再进行连接反应。

2. 反应体系的配制

1) 按下表配制 10 μL 反应体系（此步骤需在室温（20~30℃）进行，不能在冰上进行！）：

组分	体积
纯化后的 PCR 产物 [a]/Control Template [b]	0.5~8 μL
pTOPO001 Blunt Simple Vector	1 μL
10×Topo Buffer	1 μL
dd H_2O	Up to 10 μL

a. 不同大小插入片段的推荐用量：

插入片段大小（bp）	推荐用量（ng）
100~1000	10~40
1000~2000	40~80
2000~5000	80~150

b. 若需要设置对照组实验，可加入 1 μL Control Template(1000 bp, 30 ng/μL)。

2) 将所有组分轻轻吹打混匀，低速离心收集至管底。

3. 连接反应

将上述连接体系置于 PCR 仪或金属浴中（20~30℃）反应 5 min，反应完成后立即转化，请勿置于冰上或冰箱中，否则会降低连接效率。

4. 转化

1) 取 100 μL 冰浴上融化的感受态细胞，加入 10 μL 连接产物，轻柔混匀，冰上静置 30 min；
2) 42℃水浴热激 45 s，迅速冰上静置 2 min（注意不要晃动离心管，以免降低转化效率）；
3) 向离心管中加入 700 μL 不含抗生素的无菌培养基（2×YT 或 LB），混匀后 37℃，200 rpm 复苏 1h（小片段等简单连接可适当缩短复苏时间）；
4) 根据实验需求吸取不同体积的感受态细胞加到含有相应抗生素的 2×YT 或 LB 固体培养基上，均匀涂开后吹干平板，将平板倒置放于 37℃培养箱过夜培养。

5. 阳性克隆的鉴定

1) 菌液/菌落 PCR 检测（3k 以内片段推荐）
用枪头挑取白色单菌落到 10 μL 的无菌水中混匀后取 1 μL 为模板，或直接蘸取菌落至 PCR 体系中进行扩增。推荐使用载体通用引物（M13F 和 M13R）；
2) 以质粒为模板 PCR 检测（3k 以上片段推荐）
挑取单克隆接种于 LB/Amp 培养基中，37℃ 250 rpm 过夜摇菌后抽提质粒，以质粒为模板，使用载体通用引物（M13F 和 M13R）或片段特异性引物进行扩增；
3) 限制性酶切分析（可选）
挑取单克隆接种于 LB/Amp 培养基中，37℃ 250 rpm 过夜摇菌后提取质粒，使用相应内切酶进行酶切，电泳检测酶切片段大小；
4) 测序
使用 M13F(TGTAAAACGACGGCCAGT)及 M13R(CAGGAAACAGCTATGACC)进行测序，请勿使用引物 M13F（-47）/M13R（-48）。

常见问题与解决办法

Q1：克隆数少或不长克隆?

A1：

1) 连接片段纯度差。PCR 产物建议胶回收纯化（目录号：GE706），电泳或仪器检测胶回收产物浓度后再进行连接反应。不推荐多管样品过一个柱子的方式回收 DNA，会造成更多的 EDTA、胍盐等杂质残留，抑制反应。用于连接反应的胶回收产物请勿使用 TE 进行保存；
2) 连接片段用量过多或过少。请严格按照说明书推荐的用量进行体系配制；
3) 连接体系置于冰上配制。低温会降低 Topo 酶连接效率，需在室温配制反应体系。建议即连即转，请勿置于冰上或冰箱；
4) 转化操作不当。请严格按照本说明书或相应感受态说明书转化流程（注意热激温度和热激时间）进行实验；
5) 感受态效率低。自制感受态随着保存时间的增加，效率可能会降低，建议尽量使用新鲜感受态或高效商业化感受态（目录号：SCC01）；
6) 平板抗性使用错误。载体抗性为 Amp，推荐使用浓度为 100 μg/mL。

Q2：多数克隆不含插入片段?

A2：

1) PCR 产物中含较多非特异性扩增产物。建议优化引物及 PCR 条件，提高产物特异性；PCR 产物需要切胶纯化；非特异小片段包裹在目的条带中未分离，使用低浓度琼脂糖凝胶、低电压长时间电泳分离；通过增加鉴定的克隆数量来筛选阳性克隆子；
2) 环境污染引入杂片段。建议定期更换电泳液、清洁切胶仪器、使用灭菌的实验耗材等，可使用核酸清洁剂（目录号：ND709）清洁实验环境；
3) 在错误的紫外波长下切胶。建议在长波（365 nm）紫外条件下切胶（时间不宜超过 5 min），短波（254 nm）紫外易造成 DNA 损伤。

Q3：阳性克隆送测，目的片段两端碱基缺失或突变?

A3：

1) 使用的酶类制品保真度低。建议更换保真度较高的 PCR 酶类进行扩增；
2) 引物质量欠佳。化学合成的引物存在一定碱基缺失或突变的机率，建议多挑克隆或重新合成引物；
3) PCR 反应没有充分延伸。建议延长终延伸时间；
4) 在错误的紫外波长下切胶。建议在长波（365 nm）紫外条件下切胶，切胶时间不宜超过 5 min。

pTOPO001 载体图谱

