

## 产品组分

| 组分名称                            | 组分编号    | 25 RXN |
|---------------------------------|---------|--------|
| TOPO-TA/Blunt Vector (30 ng/μL) | RM30164 | 50 μL  |
| 1 kb Control Insert (30 ng/μL)  | RM30165 | 5 μL   |
| 10X Enhancer                    | RM30166 | 25 μL  |

## 产品说明

本产品是利用 Topoisomerase 可以在短期内高效的连接 DNA 片段的原理, 兼容 TA 克隆和平末端克隆的通用型克隆试剂盒。本载体质粒大小不到 2 kb, 发挥了 TOPO 载体越小, 可容纳的 DNA 片段越大的优势, 提高了大片段的连接效率。质粒越小, 转化效率越高。同时载体含有自杀基因, 当载体与插入片段连接成功, 宿主细胞才能正常生长, 从而实现零背景。

## 产品特点

1. 速度快, 一般 5 min 内即可完成连接;
2. 高效, 阳性克隆率接近 100%, 无载体自连造成的假阳性, 无需进行蓝白斑筛选;
3. 操作简单, 15-20 min 可完成连接反应到涂板操作等;
4. 通用性强, 同时兼容 TA 克隆和平末端克隆。

## 保存条件

-20℃储存。本产品采用冰袋运输, 短期内置于室外常温不影响质量, 尽量避免反复冻融。

## 适用范围

适用于连接平末端及带 A 尾的 PCR 产物。

## 操作步骤

### 1. 连接反应的准备

- a. 引物要求: 引物 5'端不能磷酸化。
- b. PCR Mix 的选择: 推荐使用 ABclonal Taq 系列或 Gloria 系列产品进行扩增。
- c. PCR 产物的要求: 确保 PCR 产物的完整性, 建议将 PCR 产物进行电泳, 判断质量。如果仅有目标条带, 无须纯化直接进行连接; 如果有杂带, 可选用 RK30100 进行胶回收纯化; 扩增模板为质粒, 模板质粒会在后续实验中引起假阳性, 建议做纯化。

### 2. 连接反应

2.1 室温 (20℃-37℃) 配制 10 μL 连接体系 (建议用 0.2 mL PCR 管):

| 试剂                   | 体积       |
|----------------------|----------|
| 纯化后的 PCR 产物          | 0.5-5 μL |
| TOPO-TA/Blunt Vector | 2 μL     |
| 10X Enhancer         | 1 μL     |
| dd H <sub>2</sub> O  | to 10 μL |

注: 如果使用 5 μL 体系连接, 各成分按照比例减半使用, 使用次数可以加倍。如果使用 1 kb Control Insert, 推荐加入量为 1 μL。

2.2 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℃-37℃) 进行**, 连接 5 min (建议置于 PCR 仪器上 25℃控温)。长片段或者连接困难片段可以延长连接时间到 10-15 min, 温度可选 37℃, 可显著增加转化子数量。连接产物置于冰上备用。立即使用感受态细胞进行转化。

注：不同大小插入片段的推荐用量如下（注意插入片段不要过量，过量会导致转化子的数量减少）：

| 插入片段大小 (bp) | 推荐用量 (ng) |
|-------------|-----------|
| 100-1000    | 10-40     |
| 1000-2000   | 40-80     |
| 2000-5000   | 80-180    |
| > 5000      | > 180     |

### 3. 快速转化

- 3.1 感受态细胞（推荐使用 ABclonal, CD001）从 -80℃ 拿出，迅速插入冰浴中，解冻融化（约 1-3 min）。
  - 3.2 立刻加入 10 μL 连接液（也可加入 5 μL，体积不超过感受态细胞体积的 1/10），用手拨打离心管底轻轻混匀（避免用枪吸打），冰浴放置 5 min。
  - 3.3 42℃ 水浴热激 60 s，迅速放回冰浴静置 2-3 min，该过程不要摇动离心管。
  - 3.4 加 500 μL LB 或者 SOC 培养基（不含抗生素），37℃ 200 rpm 振荡培养 10-20 min。
- 注：一般商品化的感受态细胞不超过 2 kb 插入片段情况下，10-20 min 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效率低、或者转化子少、插入片段长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。
- 3.5 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）。

### 4. 阳性克隆鉴定

- a. 菌液/菌落 PCR：挑取单克隆，推荐使用 ABclonal Taq 系列进行扩增；
- b. 质粒大小鉴定：挑取单克隆进行质粒提取，根据质粒电泳的结果来进行质粒大小鉴定；
- c. 酶切鉴定：根据实验设计，选择合适的内切酶进行酶切，根据电泳进行酶切鉴定；
- d. 测序鉴定：挑取单克隆，进行测序鉴定，测序引物序列如下：

M13F: TGTAACACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

注：“M13 通用引物”有多种不同的序列，不同公司默认的 M13 引物可能与本载体所用的 M13 序列有差异，合成使用前务必先核对序列。

### TOPO-TA/Blunt Vector Map and Cloning Site

