Qizyme® Zero TOPO-blunt Quick Cloning Kit

产品编号：QR1028S　　包装量：20 rxns

产品组分

组分	含量
puc*TOPO*-Blunt vector：20μl	20 μl
10x Enhancer	20 μl

产品简介

Qizyme® Zero TOPO-blunt Quick Cloning Kit 利用拓扑异构酶的再连接活性，可瞬时完成两个 DNA 片段的连接。我们提供在每个 3′磷酸基团连接有拓扑异构酶 I 的线性化 TOPO 载体，这样载体便能够轻易地将 DNA 序列与载体末端连接在一起。本产品包含自杀基因 ccdB 的载体，当插入片段与载体成功连接时，破坏 ccdB 正确表达，宿主细胞能够正常生长，否则宿主细胞不能正常生长，从而实现“Zero”背景。

保存条件

-20℃保存，≤0℃运输；使用过程中避免反复冻融。

优势

无自连、零背景，无需繁琐蓝白斑筛选，效率高达 90%以上一步，简单，准确，室温(20℃~37℃)连接，反应仅需 5~10min。

克隆实验流程

1）目的片段制备，选择高保真酶进行 PCR 扩增，且引物 5′端不能磷酸化;

2） 载体，目的片段按摩尔比~1:3，室温(20℃~37℃)孵育 5-10min;

3）反应产物转化;

4）本载体由 puc57 simple 改造而来，菌落 PCR 及测序引物选择同 puc57 simple。

具体克隆实验操作

组分	使用量
puc*TOPO*-Blunt vector	1 μl
10x Enhancer	1 μl
Inserts	x μl
Total Volume	10 μl

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	10-40
1000-2000	40-80
2000-5000	80-150

I: 克隆反应体系

反应物轻轻混匀后，室温 5-10min。反应结束后可直接用于后续转化或者-20°C 保存备用。

注：当片段较大时，可适当延长反应时间至 30min

II: 转化

1） 把感受态细胞置于冰中解冻；

2） 加入用于转化的反应产物 10μl ，冰中放置 30min 后，42℃ 热激 60～90s；

3）继续冰上放置 2min；

4）添加 500 μl S.O.C 或者 LB 培养基 ,37˚C 摇床培养 1 h；

5）将转化菌液离心后弃上清，轻轻将 沉淀悬浮后均匀涂布于含有 Amp 抗性的 LB 平板上；

6）37˚C 倒置过夜培养。

注意事项

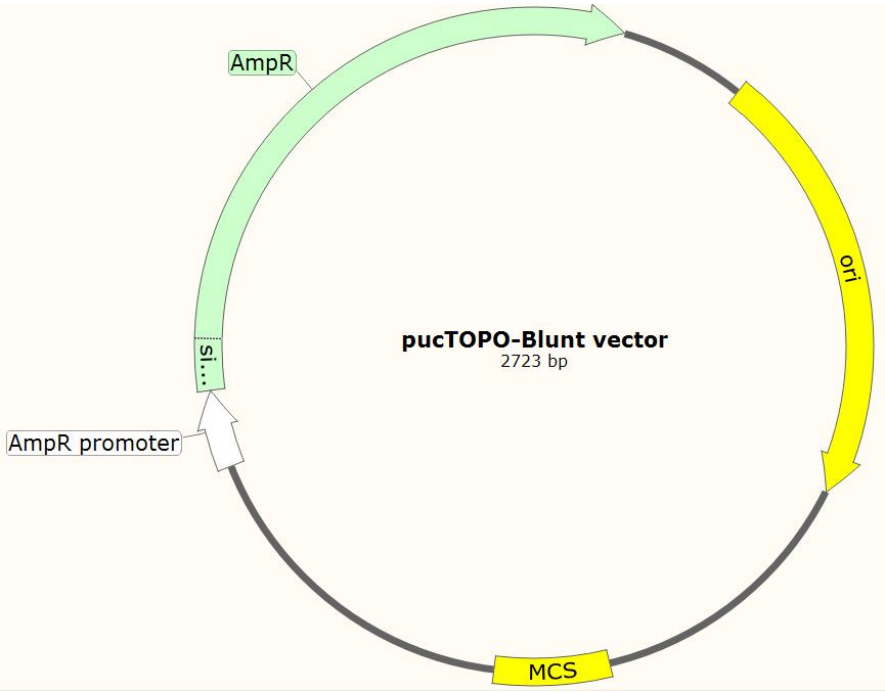
现象	问题点	对策
转化后菌落很少或者没有	DNA 浓度太低	使用推荐的 DNA 用量或上下做梯度优化
	目的片段含有污	PCR 产物切胶纯化
	感受态细胞效率太低	使用效价>1×108 cfu/μg 的感受态细胞效果更好
	引物磷酸化	使用未磷酸化引物
阳性克隆较少，多为空载体	被含有相同抗性的载体污染	PCR 产物中可能含有模板质粒，推荐切胶回收
	产物末端不是平端	使用高保真酶

附录：

附 1、载体通用测序引物序列：

Name	Sequence(5'-3')
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC
M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13F(-47)	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M13R(-48)	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA
M13F(-77)	GATGTGCTGCAAGGCGATTA
M13R(-88)	TTATGCTTCCGGCTCGTATG

附 2、载体图谱：



附 3、载体关键序列：

