版本号:250801

Zero Background pTOPO-TA Cloning Kit

零背景 pTOPO-TA 克隆试剂盒

目录号：CV14

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	20/40 次(CV1401)	80/160 次(CV1402)
pTOPO-TA Vector(30 ng/ μl)	20 μl	80 μl
1000 bp Control（30 ng/ μl）	5 μl	5 μl
10 × Enhancer	20 μl	80 μl

▲ 本 TOPO 载体连接体系按照 10 μl 一次计算可以用 20 次，如果按照其它公司产品 5 μl 一次计算，使用次数可以增加一倍，20 次可用 40 次。

▲ −20°C 储存，至少 12 个月。冰袋运输，1-2 天置于室外常温不影响质量。

❖ 产品介绍：

本制品和传统的T4连接酶原理不同,它利用了Topoisomerase可以在瞬间（几秒钟−几分钟）、高效（接近100%）连接DNA片段的原理采用本公司独创的工艺制成。

1. 可以在瞬间（几秒钟−几分钟）完成**A末端PCR产物**连接。
2. 特制的新型载体质粒大小仅仅不到2kb，充分发挥了TOPO载体越小，可容纳片段越大的优势，最大限度提高了大片段连接效率；连接后质粒大小比传统载体小2kb以上，质粒越小，转化效率越高，极大的提高了各种片段连接后的转化子数量。
3. 采用氨苄抗性载体只需0−10分钟复苏时间，比卡那抗性载体1小时复苏时间缩短6倍。
4. 最快可以省略1小时复苏步骤，热休克冰浴后，不用加LB复苏，直接将感受态涂板即可。从连接到涂板全程只需15分钟。
5. 自杀基因零背景原理，无自连假阳性，无需繁琐蓝白斑筛选和菌落PCR筛选。大部分情况下随机挑一个克隆便是有插入的（接近100%）。
6. 连接长片段能力远超传统TA克隆载体，可连接长达10 kb片段（例如连接5 kb片段，也可能达到挑10个菌落，至少8个是有插入的效果），是新一代世界领先的简单、快速、零背景免筛选的TOPO TA克隆载体。

注意：测序只能采用 M13F/M13R 通用引物测序（见后面图谱），但是不能采用 M13(−47)/M13(−48)通用引物测序。

❖ **操作步骤：**

1. 连接反应的准备：

PCR引物使用正常设计的引物即可，不需做任何改变（不能用磷酸化引物）。使用能在**PCR产物末端加一个突出的3'-A**的酶系列扩增（如Taq、LA Taq、F8 Mix、Taq Mix）。PCR产物一般建议胶回收纯化（货号：DR01)，这样可以避免后续可能的问题。如果PCR产物仅有目的条带、无非特异条带和引物二聚体，也可尝试直接进行连接反应。如果是以质粒为模板的PCR产物则最好进行纯化，因为模板质粒也可能长出菌落（但不是想构建的目的载体）。

2. 连接反应：

1) 室温设立 10 μl 连接体系（建议用 0.2 ml PCR 管，PCR 仪器控温）：

纯化后的 PCR 产物/或者 1 μl 1000 bp Control	0.5−5 μl
pTOPO-TA Vector	1 μl
10 × Enhancer	1 μl
灭菌水	X μl
总体积	10 μl

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（25°C−37°C）进行。**

▲ 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。

不同大小插入片段的推荐用量（注意过量太多了，反而导致转化子减少）：

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

2) 37°C 连接 5 分钟（建议置 PCR 仪器上控温）。

▲ 本载体推荐室温（25°C−37°C）5 分钟完成连接。长片段或者连接困难片段可以延长连接时间到 10−15 分钟，温度可选 37°C，可显著增加转化子数量。

3) 连接产物**置于冰上备用。立即**接标准的感受态转化步骤或者快速转化步骤。

3. 快速转化：

1) 感受态细胞从−80°C 拿出，迅速插入冰浴中，解冻融化（约 1−3 分钟左右）。

2) 立刻加入 5 µl 连接液(最多可 10 µl 连接液全加入，只要体积不超过感受态细胞体积的 1/10)，手指拨打（Flick）离心管底轻轻混匀(避免用枪吸打)，冰浴放置 5 分钟。

3) **热休克：**42°C 水浴热休克 60 秒，迅速放回冰浴静置 2−3 分钟，该过程不要摇动离心管。

▲ 本公司技术连接效率比竞争对手高 10−100 倍，所以如果后续发现转化子很多，甚至长糊板子，做完热休克步骤后，**可以省略步骤 4（复苏），**直接将热休克冰浴后的感受态细胞涂板，培养过夜即可。这样从连接到涂板全过程仅需要 15 分钟，超快速流程极大的简化了操作，缩短了时间。

4) **复苏（可选步骤）：**加 500 µl LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素)，37°C 200 rpm 振荡培养 10-20 分钟。

▲ 根据我们的经验，一般可以直接将培养基（如从冰箱取出温度低，应事先置 37°C 温箱回温至 22°C−37°C） 加入到感受态细胞的 1.5 ml 离心管，盖上离心管盖，水平固定在振荡培养箱中振荡培养复苏即可，不需要转移到试管培养复苏。

▲ 一般商品化的感受态细胞不超过 2 kb 插入片段情况下，热休克后 10-15 分钟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 分钟以得到更多的转化子。

▲ 本公司技术连接效率比竞争对手高 10-100 倍，追求最简单最快速的用户**可以尝试省略步骤 4（复苏），** 直接将热休克冰浴后的感受态细胞涂板，培养过夜即可。熟悉超快速流程后，以后这样从连接到涂板全过程仅需要 15 分钟，超快速流程极大的简化了操作，缩短了时间。

5) 取 100−200 µl 菌液涂板(培养板含氨苄青霉素 100 µg/ml），培养过夜。

4. 转化子的筛选鉴定：

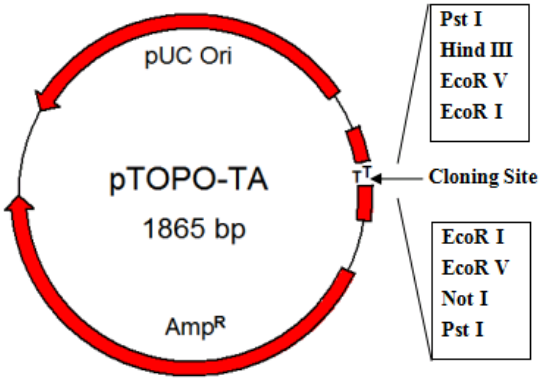
本制品采用自杀基因零背景原理，无插入自连的细菌会自杀无法生长，因此几乎没有假阳性，一般情况下，可以达到所见即所得，只要是长出来的菌落正常（不是污染的杂菌，转化子数量也不算太少），基本就 100%包含插入。因此插入片段不超过 2−3kb 的情况下强烈建议不做菌落 PCR 鉴定,直接挑 1−2 个菌去测序。

1). 一般本公司 TOPO 载体阳性率非常高，所以菌落生长正常，数量也不是太少的情况下建议直接去测序（强烈建议不做菌落 PCR 筛选）。**注意测序引物不能采用 M13(−47)/M13(−48)通用引物测序。**

2). TOPO 载体的菌落 PCR 结果容易出现假阴性（就是菌 P 失败显示没有插入或者扩增大小不对，实际却是有插入的）。因此在使用菌 P 鉴定的情况下，如菌 P 结果阳性，一般可以相信此结果。如结果是阴性，或者显示扩增出大小和预期不符合，一般不可相信，要考虑到菌 P 结果假阴性的可能，需要直接去测序鉴定，测序成功的完成实验；测序不成功的可以进一步提取质粒跑电泳看大小，或者酶切鉴定来确认。

3). 用上述培养的白色菌落的菌液抽提质粒，插入片段较大的情况下，直接跑电泳看质粒大小就直接能鉴定出有插入的质粒，还可用 EcoR I/Ecor V 单酶切释放插入片段或用其它合适的酶切，琼脂糖凝胶电泳检查片段大小，确定是否含有目的片段。

❖ **pTOPO-TA 载体图谱：**

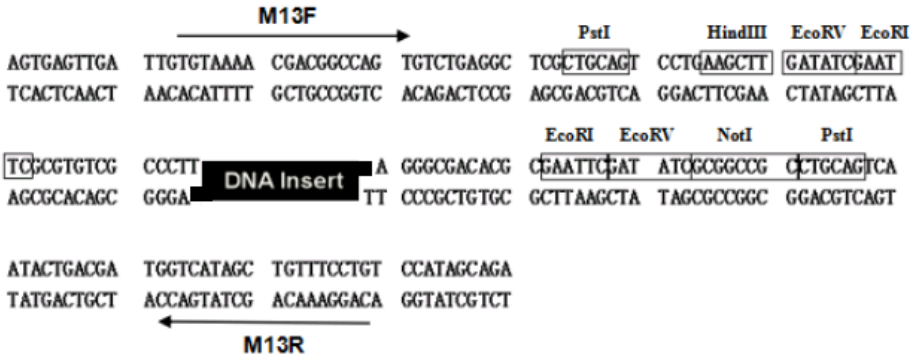


pTOPO-TA 载体

通用 M13 测序引物序列：

M13F: TGTAAAACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

注：“M13 通用引物”有多种不同的序列，且个别引物合成公司默认的 M13 引物与此载体所用的 M13 序列有差异，合成使用前务必先核对序列。

❖ **pTOPO-TA 载体多克隆位点序列：**