

HB220909

**Hieff Clone® Zero TOPO-TA Simple Cloning
Kit, MCS-Depleted**

Cat#10908

使用说明书
Product Manual



产品信息

产品名称	产品编号	规格
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

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 min 即可完成连接反应。2) 高效, 无自连, 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; 5) Hieff Clone® Zero TOPO-TA Simple Cloning Kit 不含多克隆酶切位点(MCS), 在引入后续酶切位点进行酶切操作时, 不会受到 MCS 位点的影响, 从而增加酶切效率以及克隆成功率。

产品用途

A 尾 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	产品规格
		10908ES20 (20 T)
10908-A	pESI-T simple vector (30 ng/μL)	20 μL
10908-B	1 kb control insert (40 ng/μL)	5 μL
10908-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

- 1) pESI-T simple vector 插入位点两端不含多克隆酶切位点, 需要在 PCR 设计引物时引入合适酶切位点。
- 2) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 3) 本产品仅供科研用途!

使用方法

一、Control DNA 片段的克隆实验

- 1) 在无茵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-T simple vector (30 ng/μL)	1 μL
ddH ₂ O	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。室温下孵育时, 不建议您超过 5 分钟; 但是, 如果您的 PCR 产物浓度较低或者您要克隆一个长片段, 则可以适当延长孵育时间。

- 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 μ L 连接液，加入 50 μ L 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，如果感受态细胞转化效率较低时，可以按照冰浴热激的标准程序进行。

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

6) 取 200 μ L 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 μ L，轻弹悬浮菌体，取全部菌液涂板）。

二、一般 DNA 片段的克隆实验

所插入片段为利用常规 Taq 酶(Yeasen, Cat#10101-10106)或热启动型 Taq 酶(Yeasen, Cat#10732)扩增得到的含 A 尾产物，如产物无非特异性条带、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 10 μ L 为例）

组分	用量
10 \times Enhancer	1 μ L
pESI-T simple vector (30 ng/ μ L)	1 μ L
插入片段	0.5-8 μ L
ddH ₂ O	To 10 μ L

【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°C)反应 5 min。

【注】：连接反应不可于冰上进行。室温下孵育时，不建议您超过 5 分钟；但是，如果您的 PCR 产物浓度较低或者您要克隆一个长片段，则可以适当延长孵育时间。

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

【注】：a) 也可取 5 μ L 连接液，加入 50 μ L 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，如果感受态细胞转化效率较低时，可以按照冰浴热激的标准程序进行。

4) 加 300-500 μ L LB 或者 SOC 培养基（不含抗生素），37°C 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，如果感受态转化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 μ L 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 μ L，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。

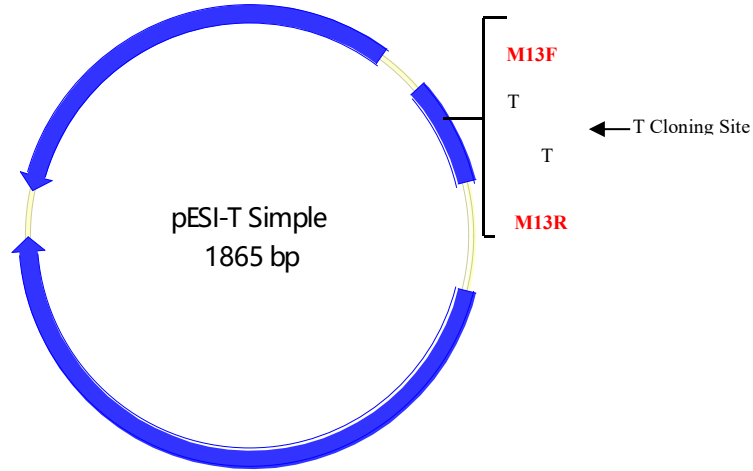
d) 测序分析：可选测序引物序列如下：

M13F: TGAAAACGACGGCCAGT

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，因此插入片段在 3 kb 以内时，可不用鉴定，直接挑取 1-2 个克隆子进行测序分析。

pESI-T simple vector 图谱



M13 Forward primer

TTTTCTACCGAAGAAAGGCCACCCGTAAGGTGAGCCAGTGAGTTGATTGT GTAAAACGACGGCCAGT GTCTGAGGCTCGCTTCAGTC
 AAAAGATGGCTTCTTTCCGGGTGGGCACTTCCACTCGGTCCTCAACTAACACATTTTGCTGCCGGTCACAGACTCCGAGCGAAGTCAG

CTG ATG CTTGTTATCGTATTTCGCGTGTGCCTT 插入片段 AGGGCGACACGCGAAGTCGATGTCGCGTCTGCCTGA
 GACTACGAACAATAGCATAAGCGCACAGCGGGA 插入片段 TTCCCGCTGTGCGCTTCAGCTACAGCGCAGACGGACT

M13 Reverse primer

AGTCAACTACTGACGATG GTCATAGCTGTTTCCTG TCCATAGCAGAAAGTCAAAGCCTCCGACCGGAGGCTTTTGACTTGATCGGCACG
 TCAGTTATGACTGCTACCAGTATCGACAAAGGACAGGTATCGTCTTTTCAGTTTTCGGAGGCTGGCCTCCGAAAAGTGAAGTACCGCTGCA

相关产品

产品名称	货号	规格
Hieff Clone® Zero TOPO-TA Cloning Kit 零背景 TOPO-TA 克隆试剂盒	10907ES20	20 T
Hieff Clone® Zero TOPO-Blunt Cloning Kit 零背景 TOPO-Blunt 平末端克隆试剂盒 ^{HOT}	10909ES20	20 T
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
2×Hieff® PCR Master Mix (With Dye) ^{HOT}	10102ES03/08	5 mL
2×Hieff® Robust PCR Master Mix (With Dye) ^{HOT}	10106ES03/08	1/5×1 mL
Hieff Canace® Gold High-Fidelity DNA Polymerase 高保真 DNA 聚合酶 ^{HOT}	10148ES60/76	100/500 U

HB220909