

Hieff Clone[®] Universal Zero TOPO TA/Blunt Cloning Kit

10906ES

产品使用说明书

Ver.CN20230728

目录

产品简介	1
产品信息	2
组分信息	2
储存条件	2
使用说明	3
载体信息	3
注意事项	5

产品简介

Hieff Clone[®] Zero TOPO-TA/Blunt Cloning Kit 是利用新一代拓扑异构酶(Topoisomerase)高效快速连接 DNA 片段的原理进一步研发而成，搭配高效的平末端化因子，兼容平末端产物及粘性末端产物的快速克隆。与传统的连接酶相比，具有以下优势：1) 快速，仅需 5 分钟即可完成连接反应。2) 高效，无自连现象，阳性克隆率接近 100%，无需设置蓝白斑筛选；3) 可连接长达 5 kb 目的产物。

产品信息

货号	10906ES08 / 10906ES20 / 10906ES50
规格	5 T / 20 T / 50 T

组分信息

组分编号	组分名称	10906ES08	10906ES20	10906ES50
10906-A	2× Hieff Clone [®] Universal TOPO Cloning Premix	25 μL	100 μL	250 μL
10906-B	1 kb control insert (40 ng/μL)	10 μL	10 μL	10 μL
10906-C	M13 Forward Primer(10 μM)	50 μL	200 μL	500 μL
10906-D	M13 Reverse Primer(10 μM)	50 μL	200 μL	500 μL

储存条件

-25~-15°C保存，有效期 1 年。

使用说明

1. 反应体系

组分	用量
2× Hieff Clone® Universal TOPO Cloning Premix	5 μL
插入片段*	0.5-5 μL
ddH ₂ O	To 10 μL

*PCR 产物不能磷酸化。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。0.1-1 kb 片段投入量推荐 20-50 ng，1-2 kb 片段投入量推荐 50-100 ng，2-4 kb 片段投入量推荐 100-200 ng，4-5 kb 片段投入量推荐 200-300 ng。

2. 反应条件

混匀上述体系，于室温(20-37°C)反应 5 min。连接反应不可于冰上进行。室温(20-37°C)下孵育时，建议孵育时间不超过 5 min，如果 PCR 产物浓度较低或者片段较长，则可以适当延长孵育时间，不宜超过 15 min（推荐使用 25°C，PCR 仪控温）。

3. 转化

- 1) 在冰上解冻克隆感受态细胞（如：DH5α Chemically Competent Cell，Cat#11802ES）。
- 2) 取 10 μL 冷却重组产物，加入到 100 μL 感受态细胞中，轻弹管壁数下混匀，在冰上放置 25 min。
- 3) 42°C 热激 60 sec，冰上孵育 2 min。
- 4) 加入 500 μL SOC 或 LB 培养基，37°C，200 rpm，摇菌 60 min。
- 5) 5000 rpm 离心 4 min，弃上清至 100 μL，用剩余培养基重悬菌体。用无菌涂布棒将菌液均匀涂抹在含有正确抗性的平板上。待菌液被培养基吸收后，倒置平板，于 37°C 过夜培养。

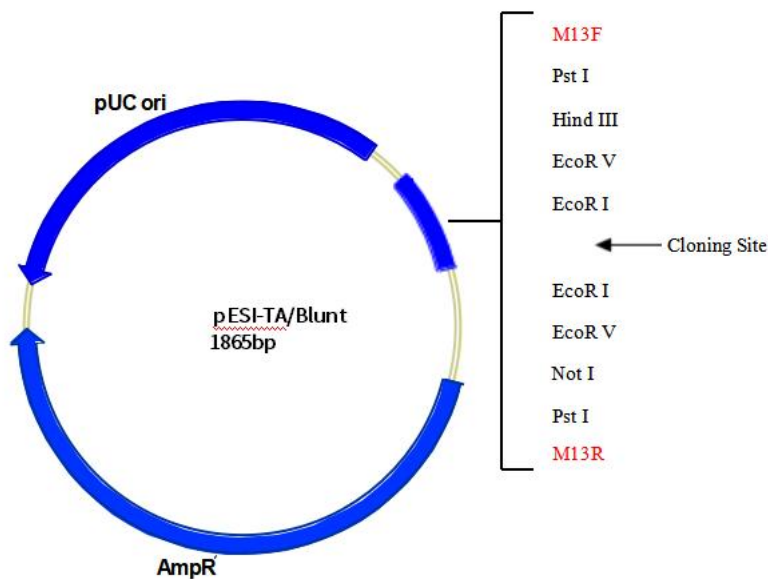
4. 克隆鉴定

可选择测序法或酶切法进行鉴定。用无菌的枪头或牙签将单个菌落挑至菌落 PCR Mix 中混匀（如：2×Hieff® Ultra-Rapid HotStart PCR Master Mix (with Dye)，Cat#10157ES），加入引物直接进行 PCR 反应。测序引物：

M13F : GTAAAACGACGGCCAGT

M13R : CAGGAAACAGCTATGAC

载体信息



CTACCGAAGAAAGGCCACCCGTGAAGGTGAGCCAGTGAGTTGATTGT GTAAAACGACGGCCAGT ^{M13 Forward primer} GTCTGAGGCTCG CTGCAG ^{PstI} TCCTG
GATGGCTTCTTCCGGGTGGGCACTTCCACTCGGTCACTCAACTAACACATTTGCTGCCGGTCACAGACTCCGAGCGACGTCAGGAC

AAGCTT ^{HindIII} GATATC GAATTC ^{EcoRV} GCGTGTGCCCTT AAGGGCGACACGCGAATTC ^{EcoRI} GATATC ^{EcoRV} GCGGCCGC CTGCAG ^{PstI}
TTCGAACTATAGCTTAAGCGCACAGCGGGAA **插入片段** TTCCCGCTGTGCGCTTAAGCTATAGCGCCGGCGGACGTC

TCAATACTGACGATG GTCATAGCTGTTTCCTG ^{M13 Reverse primer} FCCATAGCAGAAAGTCAAAGCCTCCGACCGGAGGCTTTTGACTTGATCG
AGTTATGACTGCTACCAGTATCGACAAAGGACAGGTATCGTCTTTCAGTTTTCGGAGGCTGGCCTCCGAAAACCTGAACTAGC

注意事项

1. 需自备的材料：

1) 自备试剂（仅罗列部分）：

- a. 超级感受态：转化效率 $>10^8$ cfu/ μ g，如翌圣 DH5 α 超级感受态细胞（Cat#11802ES）。
- b. 高保真酶：2 \times Hieff Canace[®] Plus PCR Master Mix (With Dye) (Cat#10154ES) 或其他等效产品。
- c. 菌落 PCR mix：2 \times Hieff[®] Ultra-Rapid HotStart PCR Master Mix (with Dye) (Cat#10157ES) 或其他等效产品。
- d. 核酸染料：YeaRed Nucleic Acid Gel Stain (10,000 \times in Water) (Cat#10202ES) 或其他等效产品。

2) 自备仪器耗材（仅罗列部分）：PCR 仪，水平电泳槽，切胶仪，EP 管等。

2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

3. 本产品仅作科研用途！



帮助客户创造价值，让世界更健康更快乐