

Hieff Clone[®] Zero TOPO-Blunt Cloning Kit

10909ES

产品使用说明书

Ver.CN20230918

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	2
载体图谱	4
注意事项	5

产品简介

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 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) 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 复苏等。4) 可连接长达 5 kb 目的产物。

用于平末端 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）。

产品信息

货号	10909ES20
规格	20 T

组分信息

组分编号	组分名称	10909ES20
10909-A	pESI-Blunt vector (30 ng/μL)	20 μL
10909-B	1 kb control insert (40 ng/μL)	5 μL
10909-C	10× Enhancer	20 μL

储存条件

-25~-15°C保存，有效期 1 年。

使用说明

1. Control DNA 片段的克隆实验

1) 在无菌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-Blunt vector (30 ng/μL)	1 μL
ddH ₂ O	7 μL

2) 混匀上述体系。于室温 (20-30°C) 反应 5 min。

*连接反应不可于冰上进行。反应时间不要超过 5 min，一般 1-2 min 即可完成连接反应，得到足够的重组子。

3) 连接产物可直接转化或于-20°C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。

*也可取 5 μL 连接液，加入 50 μL 感受态细胞中 (加入体积不超过感受态细胞体积的 1/10)。

**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，如果感受态细胞效率较低时，可以按照冰浴热激的标准程序进行。

5) 加 300-500 μL 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 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，4,000 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)。

2. 一般 DNA 片段的克隆实验

所插入片段为平末端产物，利用高保真 DNA 聚合酶 (Yeasten, Cat#10164ES) 扩增得到的产物如无非特异性条带、引物二聚体可直接进行连接反应。

否则建议胶回收后使用。

*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。

1) 按照下表配制连接体系 (以 10 μL 为例)

组分	用量
10 × Enhancer	1 μL
pESI-Blunt vector(30 ng/μL)	1 μL
插入片段	0.5-8 μL
ddH ₂ O	To 10 μL

*可根据具体实验情况按照上述比例调整反应体系。

**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。

*连接反应不可于冰上进行。反应时间不要超过 5 min，一般 1-2 min 即可完成连接反应，得到足够的重组子。

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

*也可取 5 μL 连接液，加入 50 μL 感受态细胞中 (加入体积不超过感受态细胞体积的 1/10)。

**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，如果感受态细胞效率较低时，可以按照冰浴热激的标准程序进行。

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

*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 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，4,000 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)。

6) 转化子的筛选鉴定

a. 菌落/菌液 PCR 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。

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。

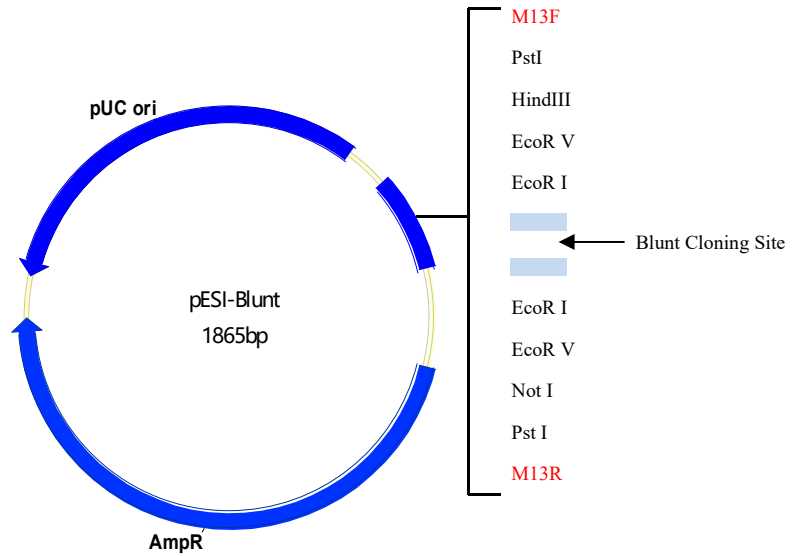
c. 酶切鉴定：根据克隆实验设计，选择合适的限制性内切酶进行鉴定。

d. 测序分析：可选测序引物序列如下：

M13F: TGTAACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

*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，因此插入片段不超过 2-3 kb 的情况下可以不用鉴定直接挑 1-2 个菌去测序。



CTACCGAAGAAAGGCCACCCGTGAAGGTGAGCCAGTGAGTTGATTGT **GTA**AAAACGACGGCCAGT **GTCTGAGGCTCG** **CTGCAG**TCCTG
 GATGGCTTCTTCCGGGTGGGCACTTCCACTCGGTCACTCAACTAACACATTTTGCTGCCGGTCACAGACTCCGAGCGACGTCAGGAC
 HindIII EcoRV EcoRI **AAGCTI**GATATC **GAATTC**GCGTGTGCGCCCTT **AAGGGCGACACGCGAATTC** **GATATC**GCGGCCGC **CTGCAG**
 TTCGAACTATAGCTTAAGCGCACAGCGGAA **插入片段** TTCCCCTGTGCGCTTAAGCTATAGCGCCGGCGGACGTC
 M13 Forward primer → PstI
 M13 Reverse primer ←
 TCAATACTGACGATG **GTCATAGCTGTTTCCTG**TCCATAGCAGAAAGTCAAAGCCTCCGACCGGAGGCTTTTGACTTGATCG
 AGTTATGACTGCTACCAGTATCGACAAAGGACAGGTATCGTCTTTCAGTTTTCGAGGCTGGCTCCGAAAAGTGAAGTGAAGT

pESI-blunt vector sequence

ORIGIN

```

1  cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttgga tctgcgctct
61  gctgaagcca gttacctcgg aaaaagagtt gtagctctt gatccggcaa acaaaccacc
121 gctgtagcgg gtggTTTTT gtttgcaag cagcagatta cgcgagaaa aaaaggatct
181 caagaagatc ctttgatTTT ctaccgaaga aaggcccacc cgtgaagggtg agccagtgag
241 ttgattgtgt aaaacgacgg ccagtgctg aggctcgtg cagtcctgaa gcttgatatc
301 gaattcgcgt gtcgccta agggcgacac gcgaattcga tatcgcgcc gcctgcagtc
361 aactagcag atggatcag ctgTTTcctg tccatagcag aaagtcaaaa gcctccgacc
421 ggaggctTTT gactgatcgc gcacgtaaga gttccaact tcaccataa tgaataaga
481 tcaactaccg gcgtatTTT tgagttatcg agatTTTcag gagctaagga agctaaatg
541 agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cctTTTTtg cggcattttg ccttctgtt
601 tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggtgacgca
661 gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa
721 gaacgTTTTt caatgatgag cactTTTaaa gttctgctat gtggcgggtt attatcccgT
    
```

781 attgacgccg ggcaagagca actcggctgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt
841 gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc
901 agtgctgcca taacatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga
961 ggaccgaagg agctaaccgc tttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgcttgat
1021 cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct
1081 gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaaact ttaactggcg aactacttac tctagcttcc
1141 cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg
1201 gcccttcggc ctggctggtt tattgctgat aaatctggag cgggtgagcg tgggtctcgc
1261 ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacag
1321 acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca
1381 ctgattaagc attggaatg agggcccaaa tgtaatcacc tggtcacct tcgggtgggc
1441 ctttctcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat
1501 cgatgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc
1561 cctggaagct cctcgtgag ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc
1621 gccttttccc ctcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cagcgtgtag gtatctcagt
1681 tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccac
1741 cgctcgcct tatccgtaa ctatcgtctt ggtccaacc cgtaagaca cgacttatcg
1801 cactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca
1861 gagtt

//

*黄底为多克隆酶切位点序列

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[®] AdvanceFast PCR Master Mix (With Dye) (Cat#10164ES) 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