

5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit

C601

Version 21.1



产品概述

本产品是第二代TOPO克隆试剂盒，包含第二代Topoisomerase、含有自杀基因 $ccdB$ 的载体以及平末端因子。使用第二代Topoisomerase，配合最合适的buffer，活性更高，进一步提高克隆效率，室温5 min完成高效连接。使用含有自杀基因 $ccdB$ 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。添加平末端化因子，使得本产品能够同时兼容TA克隆与平末端克隆。

产品组分

组分	C601-01 (25 rxns)	C601-02 (50 rxns)
5 × TA/Blunt-Zero Cloning Mix ^a	25 μl	2 × 25 μl
500 bp Control insert (20 ng/μl)	5 μl	10 μl
M13 Primer Mix (10 μM) ^b	200 μl	400 μl

a. 包含Topoisomerase和pCE2 TA/Blunt-Zero Vector (双抗性载体: Amp^r, Kan^r)

b. 包含M13 Forward Primer和M13 Reverse Primer

保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

适用范围

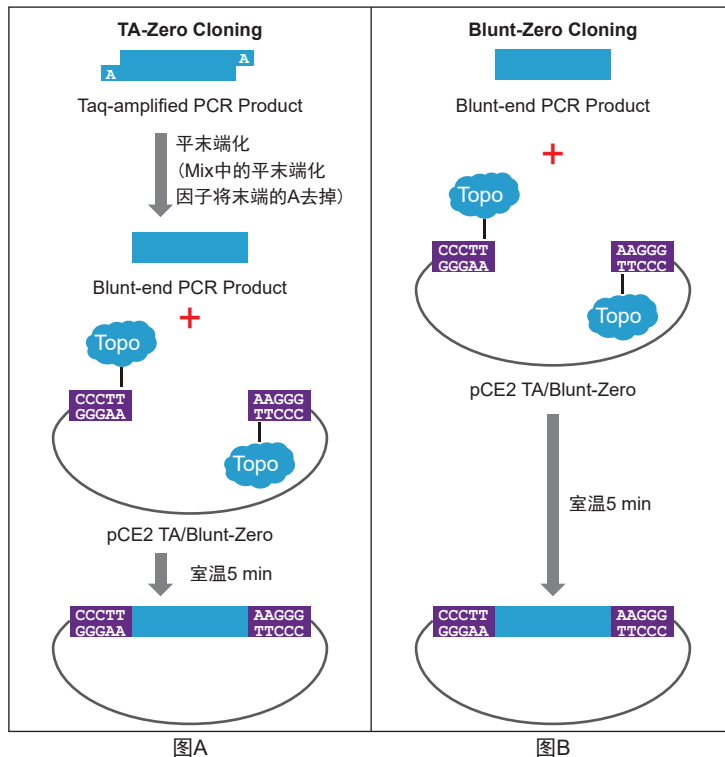
适用于连接平末端及带A尾的PCR产物。

注意事项

本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及非合理用途。

实验流程

1. 实验流程概要



图A

图B

5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit流程概要

图A: TA-Zero Cloning

- 将Taq酶(如Vazyme的Taq系列)的扩增产物(3'端带A)加入到5 × TA/Blunt-Zero Cloning Mix中，室温反应5 min。
- Mix中的平末端化因子将Taq酶扩增产物末端的A碱基去掉，形成平末端化产物。
- 平末端化产物5'-OH进攻TOPO酶与载体之间的磷酸键，TOPO酶被释放出来，载体与平末端化产物形成环形重组子。

图B: Blunt-Zero Cloning

- 将高保真酶(如Vazyme的Phanta系列)的扩增产物(平末端)加入到5 × TA/Blunt-Zero Cloning Mix中，室温反应5 min。
- 平末端产物5'-OH进攻TOPO酶与载体之间的磷酸键，TOPO酶被释放出来，载体与平末端化产物形成环形重组子。

2. PCR产物制备

- 引物要求：引物5'端不能磷酸化。
- 酶的选择：推荐使用Vazyme的Taq或Phanta系列产品。
- 产物要求：请确保PCR扩增产物的完整性；扩增结束后，电泳检测产物的产量及质量，若产物仅有目的条带，无非特异性条带和引物二聚体，可直接进行反应，否则建议进行胶回收纯化。若扩增模板为质粒，建议纯化。

3. 连接反应

配制反应体系:

组分	体积
5 × TA/Blunt-Zero Cloning Mix	1 μl
PCR纯化产物	1 - 4 μl
ddH ₂ O	to 5 μl

轻弹管底混匀，低速瞬时离心收集所有液体于离心管底，室温(20 ~ 37°C)反应5 min。反应结束后，将离心管置于冰上。

推荐反应条件:

a. 插入片段最适使用量 = [0.05 × 片段碱基数] ng;

例如插入片段为1,000 bp时，最适使用量 = [0.05 × 1,000] ng，即50 ng。因本产品对插入片段使用量兼容范围广，亦可使用下表推荐用量:

插入片段大小	推荐用量
0.05 - 1 kb	5 - 60 ng
1 - 2 kb	60 - 110 ng
2 - 5 kb	110 - 260 ng
>5 kb	>260 ng

▲ 推荐使用Nanodrop、Onedrop等进行浓度测定。

b. 反应温度: 本产品对反应温度兼容性高，室温下(20 ~ 37°C)反应即可(推荐使用25°C, PCR仪控温)。

c. 反应时间: 5 min。

4. 转化

本产品兼容多种常规感受态细胞(如DH5α competent cell (Vazyme #C502); Fast-T1 competent cell (Vazyme #C505))。

▲ 推荐使用Fast-T1 competent cell (Vazyme #C505)做后续的转化实验，该感受态细胞是目前生长速度最快的感受态细胞(涂平板之后8 h可见克隆)，且转化效率高，节省筛选时间。

5. 阳性克隆鉴定

a. 菌落/菌液PCR鉴定: 挑单克隆至10 μl ddH₂O混匀作为模板; 推荐使用2 × Rapid Taq Master Mix (Vazyme #P222)。

反应体系:

组分	体积
2 × Rapid Taq Master Mix	10 μl
M13 Primer Mix	2 μl
菌液	2 μl
ddH ₂ O	To 20 μl

反应程序:

温度	时间	循环数
95°C	3 min	} 35 cycles
95°C	15 sec	
55°C	15 sec	
72°C	15 sec/kb	
72°C	5 min	

b. 酶切鉴定: 可根据实验设计，选择合适的限制性核酸内切酶进行鉴定。

c. 质粒大小鉴定: 挑取单克隆，质粒提取后，可电泳观察质粒大小鉴定。

d. 测序分析: 直接挑取单克隆测序鉴定，测序引物可选择M13 Forward Primer, M13 Reverse Primer或自己设计。

附录: 载体序列信息

```

M13 Reverse Primer
325 CAACAGGAAC AGCTATGACC ATGATTACGC CAAGCTCAGA ATTAACCCCTC ACTAAAGGTA
    GTGTCCTTTG TCGATACTGG TACTAATGCG GTTCGAGTCT TAATTGGGAG TGATTTCCAT

EcoRI TOPO TOPO EcoRI
385 CTAGTCCCTGC AGGTTTAAAC GAATTCGCC TTT PCR Product AAGGGCGA ATTCGCGGCC
    GATCAGGACG TCCAAATTTG CTTAAGCGGG AA TTCCCGCT TAAGCGCCGG

M13 Forward Primer
435 GCTAAATTCA ATTCGCCCTA TAGTGAATCG TATTACAATT CACTGGCC GTCGTTTACAA
    CGATTTAAGT TAAGCGGGAT ATCACTTAGC ATAATGTTAA GTGACCGG CAGCAAAATGTT
  
```

Lac promoter: bases 217 - 338

LacZ ccdB fragment: bases 339 - 932

M13 Reverse primer site: bases 327 - 343

TOPO binding site (left): bases 412 - 416

TOPO binding site (right): bases 417 - 421

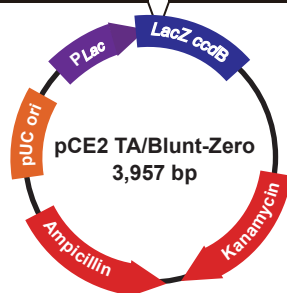
M13 Forward primer site: bases 476 - 492

Kanamycin resistance ORF: bases 1,281 - 2,075

Ampicillin resistance ORF (C): bases 2,226 - 3,239

pUC origin: bases 3,284 - 3,957

(C): complementary strand



查询pCE2 TA/Blunt-Zero vector完整的序列信息，请登录 www.vazyme.com

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。