



# Universal TOPO TA/Blunt Cloning Kit

Cat. No. CW3037

## 产品简介

Universal TOPO TA/Blunt Cloning Kit是一款快速高效的分子生物学工具，适用于将PCR扩增的DNA片段快速克隆到TOPO载体中。本试剂盒不需要限制性内切酶或外源连接酶，能够同时兼容TA克隆与平末端克隆。

## 保存条件

-20±5°C，尽量避免反复冻融。

## 产品内容

| Component  | CW3037S<br>5 rxns | CW3037M<br>25 rxns |
|--|-------------------|--------------------|
| 5×Ultra-Universal TOPO Cloning Mix <sup>1)</sup> | 10 μL             | 50 μL              |
| 1000 bp Control insert (30 ng/μL) <sup>2)</sup>  | 10 μL             | 10 μL              |
| M13 Primer Mix (10 μM) <sup>3)</sup>             | 10 μL             | 50 μL              |

注意: 1) 包含Topoisomerase和Amp抗性载体;

2) 该片段包含GFP, 用于做阳性对照, 可直接通过紫外照射观察荧光判断阳性克隆;

3) 包含M13 Forward Primer和M13 Reverse Primer。

## 产品特点

1. 既适用于Taq系列DNA聚合酶扩增的末端加“A”片段的克隆, 也适用于Pfu、KOD等高保真聚合酶扩增的平末端片段的克隆;
2. 快速: 只需5 min;
3. 高效: 阳性率接近于100%;
4. 无需蓝白斑筛选;
5. 适用于100 bp~6 kb大小片段的克隆。

## 操作步骤

1. PCR产物的制备
  - 1) 引物要求: 引物5'端不能磷酸化。
  - 2) 酶的选择: TA克隆使用Taq系列的DNA聚合酶, 平末端克隆使用Pfu、KOD等高保真系列的DNA聚合酶。
  - 3) 产物要求: PCR扩增反应需要5-10分钟终延伸以保证扩增产物的完整性, 反应结束后, 电泳检测产物的产量及质量, 然后进行凝胶回收纯化。
2. 连接反应

### 1) 配制反应体系

| 组分                                 | 体积       |
|------------------------------------|----------|
| 5×Ultra-Universal TOPO Cloning Mix | 2 μL     |
| 插入片段 <sup>1)</sup>                 | 1-8 μL   |
| ddH <sub>2</sub> O                 | to 10 μL |

注意: 1) 插入片段最适使用量 =  $(0.03 \times \text{插入片段碱基数}) \text{ ng}$ 。

对照反应体系 (可选)

| 组分                                 | 体积       |
|------------------------------------|----------|
| 5×Ultra-Universal TOPO Cloning Mix | 2 μL     |
| 1000 bp Control insert (30 ng/μL)  | 1 μL     |
| ddH <sub>2</sub> O                 | to 10 μL |

2) 轻弹混匀, 瞬时离心收集至管底。

3) 推荐使用25°C反应5 min, PCR仪控温。

4) 反应结束后, 将反应管置于冰上。

### 3. 重组产物转化

1) 克隆感受态置于冰上解冻, 取10 μL连接产物加入100 μL感受态细胞中, 轻弹管壁混匀, 冰上静置30分钟;

2) 42°C水浴热激90秒, 立即置于冰上2~3分钟;

3) 加入600 μL无抗生素的LB液体培养基, 37°C摇床220 rpm培养30分钟;

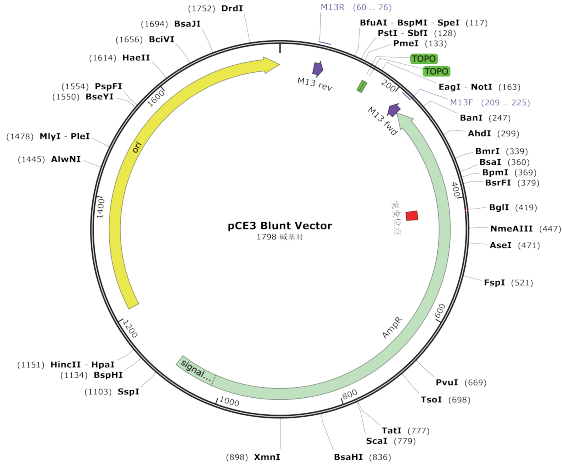
4) 取适量菌液, 用无菌涂布棒均匀涂布在Amp抗性的平板上;

5) 37°C培养箱倒置培养12~16小时。

### 4. 阳性克隆的鉴定

可根据具体情况, 选择菌落PCR鉴定、提取质粒进行酶切鉴定或测序鉴定。

附: 载体序列信息



下载完整载体序列信息,请登录康为世纪官网 [www.cwbio.com](http://www.cwbio.com),搜索“CW3037”。