

5min Fast TOPO Cloning Kit CL201



产品概述

Product Overview

本产品为经优化的 TOPO 克隆试剂盒，应用新型 Topoisomerase，添加二代平末端化因子和载体自连抑制剂，配合最适 buffer，能够在 5min 内快速完成 TA 克隆及平末端克隆。

产品组成

Product Composition

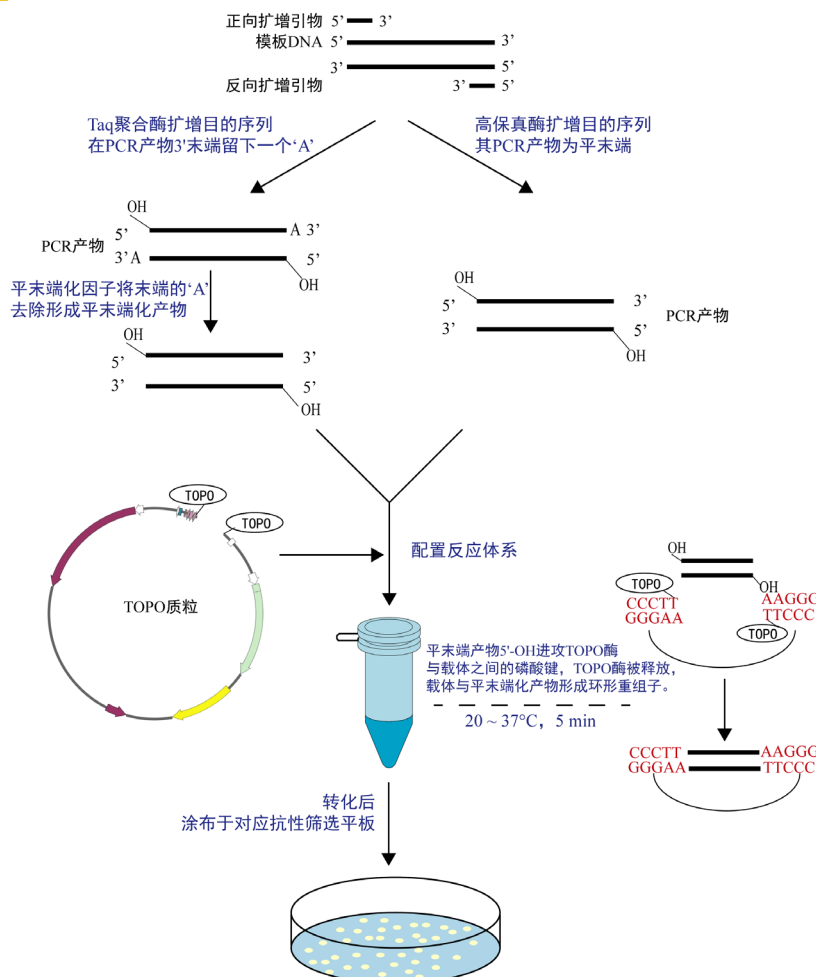
组 分	CL201 50 rxns/10 μ L
5 \times Fast Topo cloning Mix ^{*1}	2 \times 50 μ L
500bp Control insert (20 ng/ μ L)	10 μ L
M13 Primer Mix (10 μ M) ^{*2}	500 μ L

*1.包含 Topoisomerase 和 TOPO Vector (Amp 抗性载体)。

*2.包含 M13 Forward Primer 和 M13 Reverse Primer。

实验流程概要

Experimental Process



注意事项

Precautions

1. 每次使用时需使用桌面离心机点离后用移液枪轻柔吹打混匀，避免剧烈震荡，以免酶失活。
2. 反应体系需要在冰上配置，配置好的反应液需轻柔混匀离心后再进行反应。
3. 产物 5' 端不能磷酸化。

操作流程

Operation Process

1. 反应体系配置

组 分	1×
RNase Free H ₂ O	UP to 10 μL
5×Fast Topo cloning Mix	2 μL
PCR 纯化产物	1- 8 μL ^{*1}

*1. 插入片段最适使用量=[0.02×片段长度] ng，若插入片段较大时可适当增加用量，但不建议超过最适量的 2 倍

2. 克隆转化

- 1) 用移液枪轻柔吹打混匀后离心至底部。
- 2) 20 ~ 37°C 反应 5 min (推荐使用水浴锅 25°C, 5 min)。
- 3) 反应结束后，将离心管置于冰上。
- 4) 将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞：

【以化学感受态细胞 DH5α 转化方法为例。】

- ①. 感受态细胞于 -80°C 冰箱取出后于冰上融化

注：感受态细胞融化后不可久置，不可反复冻融。

- ②. 取 5 μL 连接反应液加入至 100 μL 感受态细胞中，混匀，冰浴 30 min；

注：100 μL 感受态细胞不要添加多于 10 μL 的反应液，反应液添加过多可能会抑制连接反应。

- ③. 42°C 水浴 45 sec；

- ④. 水浴后迅速置于冰上 2 min；

- ⑤. 加入 900 μL LB 或 SOC 培养基，37°C 200 rpm 培养 1 h；

- ⑥. 取 100 μL 菌培养液均匀涂布于带有抗性的 LB 固体培养基上，37°C 恒温箱倒置培养约 16 h；

- ⑦. 阳性克隆筛选。(推荐使用本公司产品 PCR101 进行菌落 PCR 鉴定，引物为本试剂盒提供的 M13 Primer Mix (10 μM))。

保存条件

Storage Conditions

-30 ~ -15°C 保存，干冰/-20°C 运输。