

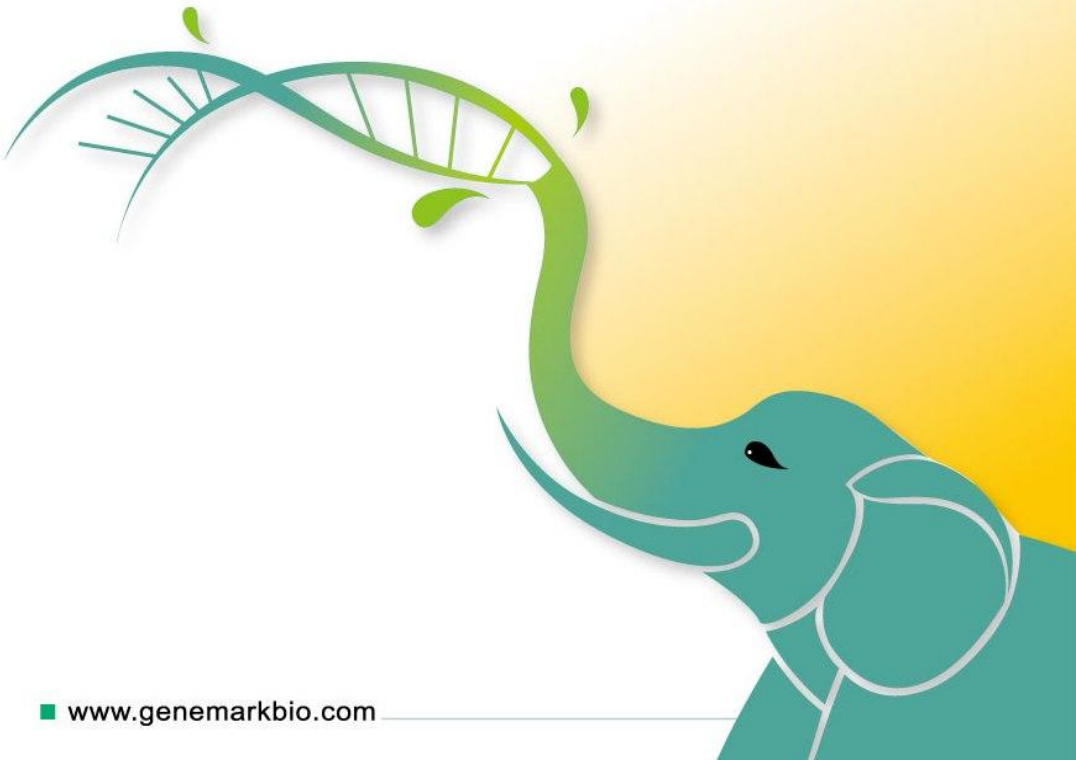
## TOPBlunt PCR Cloning Kit

產品編號：GTOP02-20 / GTOP02-40

產品包裝：20/40反應

請儲存於 -20°C

僅供研究用途使用



## 產品簡介：

TOPBlunt PCR Cloning Kit (快速選殖試劑盒)可在五分鐘內，室溫環境下快速選殖(cloning)以 Pfu 聚合酶擴增的PCR產物(鈍端產物)。此試劑盒提供的載體在其兩端共價結合拓普異構酶(topoisomerase)，可高效率的黏合鈍端的DNA產物至載體上，而不需使用一般的連接酶(ligase)。

## 產品特色

- 反應時間短 (5 min)
- 高選殖效率

## 注意事項

1. 操作時請務必使用control fragment做為控制組，提供出現錯誤時的一項指標。
2. 建議將Ligation產物做部分保留，預防出錯時可再重複Ligation實驗。
3. 塗盤所使用之菌液可依據實驗需求調整體積。例如，若轉型效率高，可使用 < 100  $\mu$ l 菌液；若轉型效率較低，可使用200~300  $\mu$ l 菌液。使用時可將菌液以4000 rpm離心2分鐘後，去除部分上清液再做塗盤。若有剩餘的樣品，請儲存於4°C供後續使用。

## 包裝內容物及保存：

TOPBlunt PCR Cloning Kit (含勝任細胞)

產品編號：GTOP02-20 / GTOP02-40

內容物	GTOP02-20	GTOP02-40
TOPBlunt Vector (10 ng/μl)	20 μl	20 μl X 2
6X TOPBlunt™ buffer	20 μl	20 μl X 2
Control insert DNA (Blunt) (1kb)	5 μl	10 μl
DH5α Competent Cell (100 μl/tube)	21 tubes	21 X 2 tubes
Control Plasmid	5 μl	5 μl
M13 Control primer mix	400 μl	400 μl X 2
SOC medium	7.5 ml	7.5 ml X 2
Sterile water	1 ml	1 ml X 2

請將勝任細胞(competent cells)儲存於-70°C，請將所有其他試劑儲存於 -20°C。反覆解凍與冷凍會造成產品的效率降低與汙染，請將試劑分裝後使用來避免汙染。

### DH5α 基因型

*SupE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

## 包裝內容物及保存：

**TOPBlunt PCR Cloning Vector (不含勝任細胞)**

**Cat. No.: GTOP02-V20 / GTOP02-V40**

Contents	GTOP02-V20	GTOP02-V40
TOPBlunt Vector (10 ng/μl)	20 μl	20 μl X 2
6X TOPBlunt™ buffer	20 μl	20 μl X 2
Control insert DNA (1kb)	5 μl	10 μl
M13 Control primer mix	400 μl	400 μl X 2

將 TOPBlunt PCR Cloning Vector 及 control insert DNA 儲存於-20°C。反覆解凍與冷凍會造成產品的效率降低與污染，請將試劑分裝後使用來避免污染。

## 操作步驟

### 黏合反應：

所有操作步驟均需在無菌環境處理。

1. 操作前請先以電泳分析PCR片段確實為有興趣的片段。該PCR產物請以“PCR 產物純化套組”或是“膠純化系統”先進行產物的純化。產物純化可去除不希望之干擾，例如引物二聚體等，可提升黏合反應效率。
2. 載體(vector)必須在冰上解凍，請勿重複的冷凍與解凍。解凍後請離心，將管壁上的液體離下。
3. 將以下材料加入滅菌過的離心管中混合：  
**載體(vector)與插入片段(insert fragment)的莫爾比應控制在 1:3~1:8。超過此範圍會影響Ligation反應。**

內容物	反應條件	
黏合反應所需內容物	樣品	對照組
PCR product (Blunt-end)	X $\mu$ l	—
Control insert (Blunt) (1 kb, 50 ng/ $\mu$ l)	—	1 $\mu$ l
TOPBlunt vector (10 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
6X TOPBlunt™ buffer	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Sterile water	Up to 6 $\mu$ l	Up to 6 $\mu$ l

4. 將混合液輕輕混勻，快速離心。  
將混合液置於室溫 (25°C) 反應 5 min，反應完成後進行細胞轉型 (transformation)。

### 細胞轉型 (Transformation)

1. 準備agar培養盤進行細胞轉型。  
將 80  $\mu$ l IPTG (50 mM) 及 80  $\mu$ l X-gal (20 mg/ml) 均勻塗抹於含有ampicillin (50  $\mu$ g/ml) 之agar培養盤表面。於37°C靜置至表面狀態已適合使用。
2. 細胞轉型步驟：
  - a. 取出DH5 $\alpha$  勝任細胞(competent cells)，放置於冰上回溶。小心的將部分 Ligation混合液加至50~100  $\mu$ l DH5 $\alpha$ 勝任細胞。Ligation混合液體積需為少於勝任細胞 1/10的體積。輕搖晃混合後，置於冰上30分鐘。  
建議：將control plasmid也轉型到勝任細胞中測試轉型效率。使用 1  $\mu$ l 的 control plasmid，依照以上步驟進行轉型。
  - b. 將勝任細胞於42°C水浴槽中 Heat-shock 45 秒 (勿搖晃)。立即將反應液置於

- 冰上 2~3分鐘 (勿搖晃)。
- c. 每一反應液中加入250  $\mu\text{l}$  SOC培養基 (無抗生素，需預先回溫)，在37°C搖晃培養1小時 (~225 rpm)。
  - d. 輕將反應液混合均勻。將 150  $\mu\text{l}$ 的反應液(transformant)均勻塗抹於含有抗生素的LB agar plate表面，確保菌落生長時有足夠空間進行挑菌。塗抹時請使用滅過菌的塗抹棒，然後將表面微乾之LB培養盤於 37°C培養 12~16小時。

## 偵測

- a. **快速檢測:** 利用Bacterium PCR檢測DNA片段是否有正確的接入載體中。
  - i. 挑出要測試的菌落，每一菌落準備總體積 25  $\mu\text{l}$  的 PCR Master Mix。(例如，10 個菌落準備 275  $\mu\text{l}$  的 master mix (25  $\mu\text{l}$  x 11))。

每一 25  $\mu\text{l}$  PCR mixture 中含有：

Component	Volume
Water	18.3 $\mu\text{l}$
10X Reaction Buffer with $\text{MgCl}_2$	2.5 $\mu\text{l}$
2.5 mM dNTP	2 $\mu\text{l}$
M13 Control primer mix (5 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{l}$
5 u/ $\mu\text{l}$ Taq DNA Polymerase	0.2 $\mu\text{l}$

或使用 PCR Master Mix 套組 (GeneMark 編號：RP02)

Component	Volume
Water	18 $\mu\text{l}$
5X PCR master mix	5 $\mu\text{l}$
M13 Control primer mix (5 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{l}$

- ii. 依據欲測試的管數，將 Mix 分裝到所需的 PCR 小管中。

- iii. 使用滅過菌之 10 或 200  $\mu$ l 槍頭(pipet tip)或是牙籤，輕點挑選出的菌落，將槍頭或牙籤於 25  $\mu$ l master mix 中攪拌混合。  
**建議：勿取過多的菌，或是將 agar 加到 master mix 中，避免影響到 PCR 反應。**

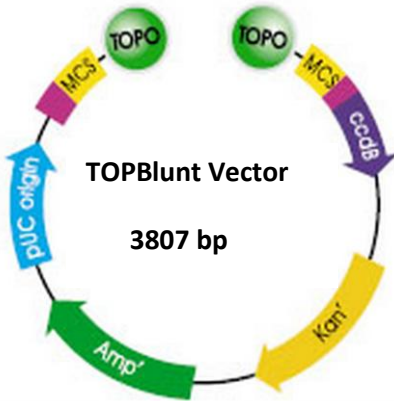
- iv. 依下列條件進行 PCR 反應：

Cycles	Temperature	Time
1	94°C	2 min
30	94°C	30 sec
	56°C	20 sec
	72°C	1 min (1 min/kb)
1	72°C	5 min

- v. 取 2~5  $\mu$ l PCR 產物於 1.5~2% agarose gel 進行電泳分析(electrophoresis analysis)。若 DNA 片段(insert fragment)有成功接入，PCR 產物大小為 202 bp 加上 DNA 片段大小。例如：DNA 片段為 300 bp，則 PCR 產物應為 502 bp。若 DNA 片段未成功接入，PCR 產物大小則為 202 bp。
- b. **一般檢測：**挑選單一菌落，放入1~5 ml 液態 LB 培養基中(含50~100  $\mu$ g/ml ampicillin)，於37°C進行隔夜搖晃培養。使用市售的質體純化試劑盒(GeneMark編號DP01)或是既有的方法純化質體。純化之質體可用*EcoR*I或其他限制酵素進行限制酵素反應(請參考以下圖片資訊)。
- c. **定序：**將insert fragment進行定序，確定為有興趣之序列片段。

## TOPBlunt Vector Map

質體3'端以共價鍵結接有一個 Topoisomerase 分子 (位置294、295)。因此當帶有3' A-Tail的PCR產物加入時，Vector可與之形成鏈結。Taq DNA聚合酶合成之PCR產物，會帶有3' A overhang。



## Comments for TOPBlunt Vector (3807 nucleotides)

- Lac promoter/operator : 95-216
- M13 Reverse Primer binding site : 205-221
- LacZ $\alpha$  ORF : 217-534
- MCS, Multiple Cloning Sites : 234-357
- M13(-20) Forward Primer binding site : 391-406
- ccdB ORF : 544-846
- Kan<sup>r</sup> gene : 1057-1989
- Amp<sup>r</sup> gene : 2007-2867
- pUC origin : 3012-3685

## TOPBlunt Vector Cloning Site

										<i>lacZ<math>\alpha</math></i> ATG													
										M13 Reverse Primer													
CAG	GAA	ACA	GCT	ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	GTA	CCG	AGC	TCG	GAT	CCA	CTA					
GTC	CTT	TGT	CGA	TAC	TGG	TAC	TAA	TGC	TAA	TGC	GGT	TCG	AAC	CAT	GGC	TCG	AGC	CTA	GGT	GAT			
										BstXI		EcoRI											
GTA	ACG	GCC	GCC	AGT	GTG	CTG	GAA	TTC	GCC	CTT	AAG	GGC	GAA	TTC	TGC	AGA							
CAT	TGC	CGG	CGG	TCA	CAC	GAC	CTT	AAG	CGG	GAA	PCR Product	TTC	CCG	CTT	AAG	ACG	TCT						
										EcoRV		BstXI		NotI		XhoI		NsiI		XbaI		ApaI	
TAT	CCA	TCA	CAC	TGG	CGG	CCG	CTC	GAG	CAT	GCA	TCT	AGA	GGG	CCC	AAT	TCG	CCC	TAT					
ATA	GGT	AGT	GTG	ACC	GCC	GGC	GAG	CTC	GCA	CAT	AGA	TCT	CCC	GGG	TTA	AGC	GGG	ATA					
										M13 Forward (-20) Primer													
AGT	GAA	TCG	TAT	TAC	AAT	TCA	CTG	GCC	GTC	GTT	TTA	CAA	CGT	CGT	GAC	TGG	GAA	AAC					
TCA	CTT	AGC	ATA	ATG	TTA	AGT	GAC	CGG	CAG	CAA	AAT	GTT	GCA	GCA	CTG	ACC	CTT	TTG					



## 錯誤排除

問題	評論與建議
<p><b>培養盤上只有少量甚至無菌落</b></p> <p>a) 抗生素濃度不正確</p> <p>b) Ligation 混和液中 DNA 量過少</p> <p>c) 勝任細胞效能降低</p>	<p>確認抗生素作用濃度</p> <p>增加黏合反應中興趣片段與載體總量</p> <p>使用高效率勝任細胞 (<math>\geq 1 \times 10^8</math> cfu/<math>\mu</math>g DNA) 計算轉型效率： 1. 加入 1 <math>\mu</math>l 控制組 plasmid (100 pg)至1管勝任細胞中。 2. 進行細胞轉型步驟。</p> <p><b>細胞轉型效率公式 (cfu/<math>\mu</math>g DNA):</b> 培養盤上總菌落數/塗盤 DNA 量 (ng) X 1000 ng/<math>\mu</math>g</p>
<p><b>培養盤上僅生長出少量白色菌落，甚至無菌落生長</b></p> <p>a) 緩衝液稀釋使用不適當</p> <p>b) 黏合反應失敗</p> <p>c) PCR產物成功黏合載體，但未破壞 lacZ 基因</p>	<p>試劑盒中提供的 6X TOPfast™ 緩衝液為6倍濃度，在 6 <math>\mu</math>l的總反應體積中需加入1 <math>\mu</math>l緩衝液。</p> <p>1) 避免重複凍解冷凍。 2) 確認PCR產物3' 帶有A-突出端，必要時需進行 A-tailing反應。 3) 優化載體(vector)與插入片段(insert fragment)的莫爾比。 4) 優化黏合反應條件，選取適當作用溫度及時間。</p> <p>篩選藍色及淡藍色的菌落，避免偽陰性結果產生。</p>

d) 引物二聚體污染	PCR產物請以“PCR 產物純化套組”或是“膠純化系統”先進行產物的純化。
e) X-gal以及IPTG使用量錯誤	確認 X-gal/IPTG 的使用濃度。



**GeneMark**

**GMbiolab Co., Ltd.**  
**Taichung, Taiwan**  
[tech@genemarkbio.com](mailto:tech@genemarkbio.com)