

pTO-T 快速克隆试剂盒

贮存 -20℃保存 12 个月，避免反复冻融

概述：pTO-T 快速克隆试剂盒利用拓扑异构酶 I (Topoisomerase I) 的切割再连接的特点将片段克隆到载体中。适用于克隆由 Taq DNA 聚合酶扩增的 3' 端带有“A”末端的产物。载体元件包含高拷贝的复制子，Amp 抗性基因，可以用引物对 M13F(-47)和 M13R(-48)进行菌落 PCR 鉴定阳性克隆。

产品组成：

组成	CL05020	CL05060
2×pTO-T Mix (每 5ul Mix 含 30ng 载体 pTO-T)	100ul	100ul×3
Control Insert	5ul	5ul
M13F 引物(10uM)	50ul	150ul
M13R 引物(10uM)	50ul	150ul

产品特点：

- 连接反应仅需 5 分钟
- 体系配置简单，只需加入片段和 pTO-T Mix
- 适用于 Taq DNA 聚合酶扩增的 3' 端带有“A”末端的产物
- 具有氨苄青霉素
- 无需蓝白斑筛选，阳性率大于 90%

质量控制检测：

使用本试剂盒连接 Control Insert (1kb)，涂布于 A 抗性平板上，用菌落 PCR 或质粒酶切方法验证次日长出的克隆，阳性克隆达到总克隆数 90%及以上。

使用说明

1、连接反应

按下表，在一个 0.2ml PCR 管内依次加入

成分	体积
DNA 片段	1-5ul (20ng-200ng)
2×pTO-T Mix	5ul (30ng 载体)
补水至	10ul

注：加完试剂后，轻轻混匀低速离心，使溶液集中在管底。**注意：此步骤不要在低温条件（冰水浴）上操作。**

2、反应温度及片段要求

室温下 (20℃-30℃) 放置 5~10 分钟，然后将离心管放置在冰上。当天如不进行转化实验，请将连接产物置于-20℃保存。注意 DNA 片段的用量见下表：

片段大小 (bp)	最佳用量 (ng)
100-1000	20-50
1000-2000	50-100
2000-5000	100-200

如果 PCR 产物电泳检测仅有单一条带，无引物二聚体和非特异性条带存在，可直接取产物原液进行克隆。

3、阳性对照反应

取 5ul 试剂盒提供的 1kb 长度的对照片段进行克隆。

4、转化

- 取 10ul 连接产物到 100ul 刚刚融化的 DH5a 或 TOP10 感受态细胞中(不建议使用 TOP10F' 感受态细胞) 轻轻混匀, 冰浴 10-30 分钟。
- 42°C 水浴中热击 90 秒。
- 立刻置于冰水浴中 2 分钟。
- 加入 500ul 无菌的不含抗生素的 SOC 或 LB 液体培养基, 37°C, 200-250rpm 振荡培养 60 分钟。
- 吸取 200ul 菌液涂布。为了得到更多的菌落, 可以先 4000rpm 离心 1 分钟, 去掉部分上清, 用移液器轻吹菌体, 充分悬浮菌液, 取全部菌液涂布, 然后 37°C 培养过夜 (12-16 小时)

5、阳性重组子的鉴定

菌落 PCR

用 10ul 枪头挑选克隆至预先加有 10ul 无菌水或 LB 培养基的 PCR 管中, 吹打混匀。取 2ul 细菌悬液为模板, 50ul PCR 体系中加入 10uM 浓度的 M13F/M13R 各 1ul 进行 PCR 扩增。

1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。电泳条带大小与插入片段大小相近 (由于 M13 引物在克隆位置的两侧, 所以 PCR 扩增出的 DNA 的长度比插入片段大 156bp) 的克隆可视为阳性克隆。菌落 PCR 鉴定重组体时一定要设立一个不加菌液的阴性对照, 以排除 PCR 扩增的条带为假阳性的可能。

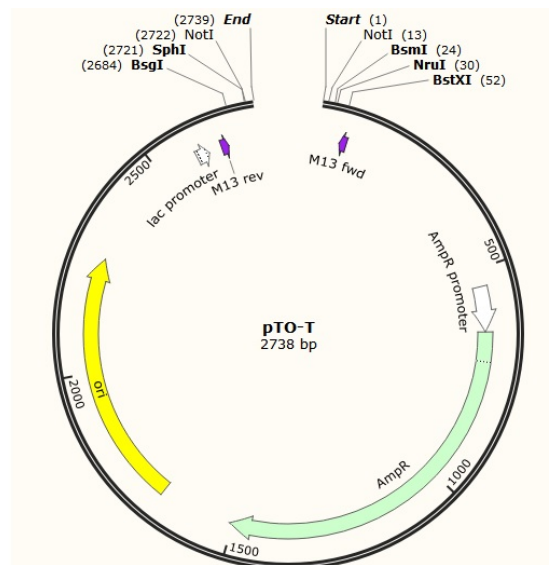
测序: 用 M13F 和 M13R 对阳性克隆的质粒进行测序分析。

常见问题分析

转化次日平板克隆少, 或阳性率低?

- 感受态效率低, 使用转化效率 $> 5 \times 10^7$ cfu/ug 的感受态细胞。
- 连接反应在低温下操作, 应当在室温下操作。
- 连接反应时间过长, 室温下 5 分钟就可以, 时间过长, 连接效率会下降。
- PCR 片段加入量太多或太少, 按照推荐量加入。
- PCR 纯度低, 切胶时在紫外灯下照射时间长, 需重新制备。
- PCR 扩增结束后, 应该再延伸 5-10 分钟, 确保片段延伸完全。
- 转化后没有复苏培养, 可以加入 SOC 或 LB 液体培养基, 培养 60 分钟。
- 克隆基因可能对宿主菌有毒性, 比如某些编码膜蛋白和 DNA 结合蛋白的基因, 某些启动子和调节序列基因, 或含有倒置或串联重复序列的基因, 选用 25-30°C 室温过夜培养, 或者选择转化能够有效针对毒性基因的 EPI400 感受态细胞。

pTO-T 载体图谱和多克隆位点序列



M13 rev
 CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGCTTGCACGCCTCTGCACTCGTCGG
 TCCCGGCATGCGGCCGCGTGTCCCTTNNNNAGGGCGACACGCGGCCGCCGACGCAT
 TCGCGAAGTACCGATCTCCAATTCCTGGCCGTCGTTTATC
 M13 fwd