|  |  |
| --- | --- |
| # CL04920 | 20次 |
| # CL04926 | 60次 |

|  |
| --- |
| **pTO快速克隆试剂盒** |

|  |
| --- |
| **贮存** -20℃避光保存12个月，避免反复冻融 |

**概述**：pTO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Pfu、KOD、Phusion、Q5和GPV8等高保真性DNA聚合酶扩增的平末端PCR产物。试剂盒中的2×TOPO Mix的成分为：和拓扑异构酶偶联的线性化载体pTO、2×反应缓冲液体系。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 | CL04920 | CL04926 |
| 2×TOPO Mix  （每5ul Mix含50ng载体pTO） | 100ul | 100ul×3 |
| Control Insert | 5ul | 5ul |
| M13F引物 | 0.1OD | 0.1OD×3 |
| M13R引物 | 0.1OD | 0.1OD×3 |

* **产品特点**：

• 连接反应仅需1-5分钟

• 体系配置简单，只需加入片段和2×TOPO Mix

• 适用于平末端PCR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×TOPO Mix | 5ul（50ng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0.5-1ul产物原液进行克隆。

**3、阳性对照反应**

取1ul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50-100ul刚刚融化的DH5a感受态细胞中（不建议使用TOP10感受态细胞），轻轻混匀，冰浴10-30分钟。
* 42℃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℃，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℃培养过夜（12-16小时）

**5、 阳性重组子的鉴定**

菌落PCR

首先将引物稀释到5uM浓度，往M13F(-47)和M13R(-48) 引物干粉管加90ul灭菌水即可。

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，25ul PCR体系中加入5uM浓度的M13F(-47)/M13R(-48)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138bp）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(-47)和M13R(-48)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>5×107 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℃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载体图谱和多克隆位点序列**

