

零背景 pTOPO-TA Simple 克隆试剂盒/不含多克隆酶切位点 MCS

Zero Background pTOPO-TA Simple Cloning Kit

使用说明书

货号: CV216

试剂盒组成:

试剂盒组成	20 次 (CV216-01)	80 次 (CV216-02)
pTOPO-Blunt Vector(30ng/μL)	20μL	80μL
1kb Control(40ng/μL)	5μL	5μL
10× Enhancer	20μL	80μL

产品储存: -20°C 储存, 至少 12 个月。冰袋运输, 1-2 天置于室外常温不影响质量。

产品介绍: 本制品和传统的 T4 连接酶原理不同, 它利用了 Topoisomerase 可以在瞬间(几秒钟-几分钟)、高效(接近 100%)连接 DNA 片段的原理采用本公司独创的工艺制成。

1. 平末端 PCR 产物不需要先加 A, 在瞬间(几秒钟-几分钟)完成平末端 PCR 产物连接。
2. 特制的新型载体质粒大小仅仅不到 2kb, 充分发挥了 TOPO 载体越小, 可容纳片段越大的优势, 最大限度提高了大片段连接效率, 连接后质粒大小比传统载体小 2kb 以上, 质粒越小, 转化效率越高, 极大的提高了各种片段连接后的转化子数量。
3. 采用氨苄抗性载体只需 10 分钟复苏时间, 比卡那抗性载体 1 小时复苏时间缩短 6 倍。
4. 最快可以不用冰浴和热休克, 室温 5 分钟内完成转化; 无需 1 小时复苏, 只需 37°C 10 分钟复苏便可以涂板。从连接到涂板最快只需 15-20 分钟。
5. 自杀基因零背景原理, 无自连假阳性, 无需繁琐蓝白斑筛选和菌落 PCR 筛选。大部分情况下随机挑一个克隆便是有插入的(接近 100%)。
6. 连接长片段能力远超传统 Blunt 克隆载体, 可连接长达 10kb 片段(例如连接 5kb 片段, 也可能达到挑 10 个菌落, 至少 8 个是有插入的效果), 是新一代世界领先的简单、快速、零背景免筛选的 TOPO Blunt 平末端克隆载体。

注: 测序只能采用 M13F/M13R 通用引物测序(见后面图谱), 但是不能采用 M13(-47)/M13(-48)通用引物测序。菌落 PCR 可使用和测序相同的引物。

◆操作步骤:

1. 连接反应的准备:

PCR 引物使用正常设计的引物即可, 不需做任何改变(不能用磷酸化引物)。使用扩增产物是平末端的高保真聚合酶系列扩增(如 Pfu、Phusion、A8 Mix、A9 Mix)。PCR 产物一般建议琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收(货号: DR201), 这样可以避免后续可能的问题。如果 PCR 产物仅有目的条带、无非特异条带和引物二聚体, 也可尝试直接进行连接反应。如果是质粒为模板的 PCR 产物则最好进行纯化, 因为模板质粒也可能长出菌落(但不是想构建的目的载体)。

2. 连接反应:

1) 室温(25°C-37°C)设立 10μL 连接体系(建议用 0.2mL PCR 管, PCR 仪器控温):

Components	Volume
纯化后的 PCR 产物/或者 1μL 1kb control	0.5-5μL
pTOPO-Blunt Vector	1μL
10× Enhancer	1μL
灭菌水	XμL
总体积	10μL

加完试剂后, 用移液器轻轻吹打混匀或者轻弹管底混匀, 低速瞬时离心收集所有液体在离心管底, 注意此步骤不能在冰上进行, 只能在室温(25°C-37°C)进行。

注: 如果使用 5μL 体系连接, 各成分按照比例减半使用, 使用次数可以加倍。

不同大小插入片段的推荐用量(注意过量太多了, 反而导致转化子减少):

插入片段大小(bp)	推荐用量(ng)
100-1000	10-40
1000-2000	40-80
2000-5000	80-180

2) 室温(25°C-37°C)连接 5 分钟(建议置 PCR 仪器上控温)。

注: 本载体推荐室温(25°C-37°C)5 分钟完成连接。长片段或者连接困难片段可以延长连接时间到 10-15 分钟, 温度可选 37°C, 可显著增加转化子数量。

3) 连接产物置于冰上备用。立即接标准的感受态转化步骤或者快速转化步骤。

3. 快速转化:

1) 感受态细胞从-80°C拿出, 迅速插入冰浴中, 解冻融化(约 1-3 分钟左右)。

2) 立刻加入 5μL 连接液(最多可全部加入, 只要体积不超过感受态细胞体积的 1/10), 用手拨打离心管底轻轻混匀(避免用枪吸打), 冰浴放置 5 分钟。

3) 42°C水浴热激 60 秒, 迅速放回冰浴静置 2-3 分钟, 该过程不要摇动离心管。

注: 此步骤首选建议 42°C水浴 60 秒热激。但是根据我们的经验, 大部分商品化的 TOP10 和 DH5a 感受态细胞此步骤也可将离心管置于室温(>22°C)进行, 时间不需十分准确, 夏季或室温较高时, 可放置 5-8 分钟左右; 如果室温较低, 可延长至 8-15 分钟左右。有经验的客户可以根据具体情况尝试无热激转化。

4) 加 500μL LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素), 37°C 200rpm 振荡培养 10-20 分钟。

注: 根据我们的经验, 一般可以直接将培养基(如从冰箱取出温度低, 应事先置 37°C温箱回温至 22°C-37°C)加入到感受态细胞的 1.5mL 离心管, 盖上离心管盖, 水平固定在振荡培养箱中振荡培养复苏即可, 不需要转移到试管培养复苏。

一般商品化的感受态细胞不超过 2kb 插入片段情况下, 热休克后 10-15 分钟复苏可以得到足够多转化子, 如果使用实验室自制的感受态效率低、或者转化子少、插入片段长的情况下可以提高复苏时间到 30-60 分钟以得到更多的转化子。

5) 取 100-200μL 菌液涂板(培养板含氨苄青霉素 100μg/mL), 培养过夜。(如果预计转化子少, 为得到较多克隆, 4000rpm 离心 1 min, 吸弃掉部分上清, 保留 100-150μL, 轻弹悬浮菌体, 取全部菌液涂板)

4. 转化子的筛选鉴定:

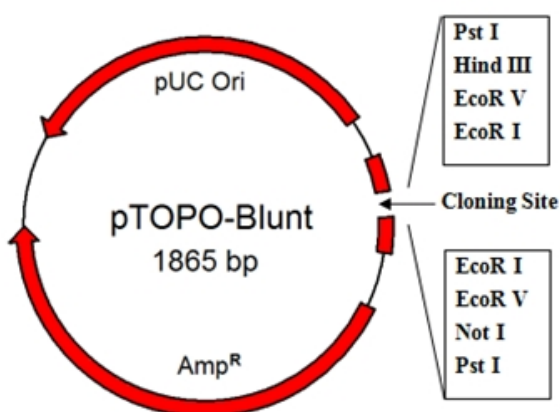
本制品采用自杀基因零背景原理, 无插入自连的细菌会自杀无法生长, 因此几乎没有假阳性, 一般情况下, 可以达到所见即所得, 只要是长出来的菌落正常(不是污染的杂菌, 转化子数量也不算太少), 基本就包含插入。因此插入片段不超过 2-3kb 的情况下可以不用菌落 PCR 鉴定, 直接挑 1-2 个菌去测序。

1) 一般本公司 TOPO 载体阳性率非常高, 所以菌落生长正常, 数量也不是太少的情况下建议省略菌落 PCR/菌液 PCR 鉴定直接去测序。注意测序引物不能采用 M13(-47)/M13(-48)通用引物测序。

2) TOPO 载体的菌落 PCR 结果容易出现假阴性。因此在使用菌落 PCR 鉴定的情况下, 如菌落 PCR 结果阳性, 一般可以相信此结果。如结果是阴性, 或者显示扩增出大小和预期不符合, 一般不可相信, 要考虑到菌落 PCR 结果假阴性的可能。需要进一步提取质粒电泳跑大小, 或者酶切鉴定来确认。

3) 用上述培养的白色菌落的菌液抽提质粒, 插入片段较大的情况下, 直接跑电泳看质粒大小就直接能鉴定出有插入的质粒, 还可用 EcoR I/EcoR V 单酶切释放插入片段或用其它合适的酶切, 琼脂糖凝胶电泳检查片段大小, 确定是否含有目的片段。

pTOPO-Blunt 载体图谱:



pTOPO-Blunt 载体

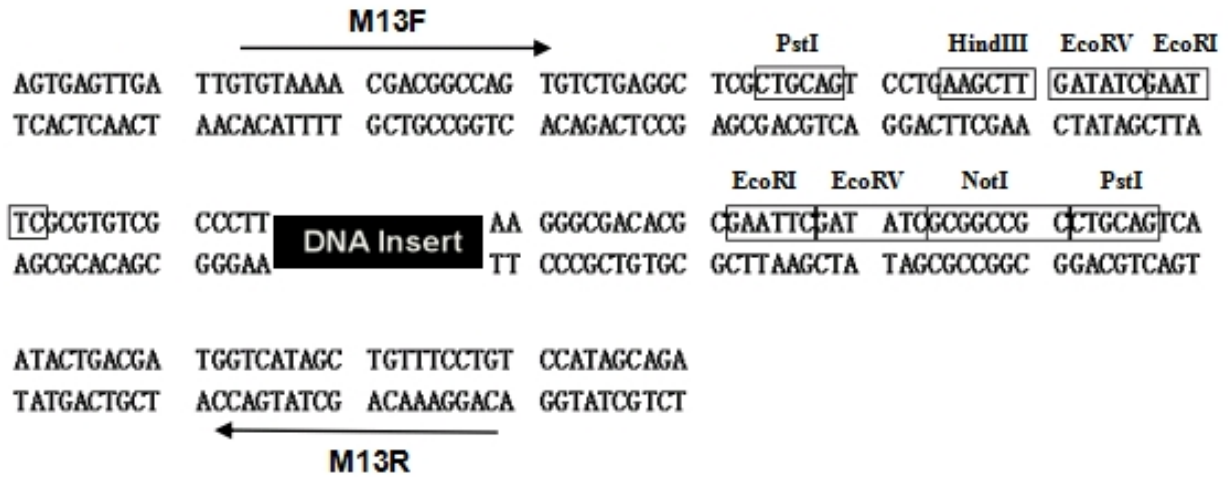
通用 M13 测序引物序列:

M13F: IGTAAAACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

注: “M13 通用引物”有多种不同的序列, 且个别引物合成公司默认的 M13 引物与此载体所用的 M13 序列有差异, 合成使用前务必先核对序列。

pTOPO-Blunt 载体多克隆位点序列:



=====

