

# pTOPO-ENTR/D 5 分钟定向 Gateway 入门克隆构建试剂盒

## pTOPO-ENTR/D Directional Cloning Kit

### 使用说明书

货号: CV218

试剂盒组成:

试剂盒组成	20 次 (CV218-01)
pTOPO-ENTR/D Vector(30ng/μL)	20μL
10× Enhancer	20μL

**产品储存:** -20°C 储存, 至少 12 个月内不影响使用效果。

**产品介绍:**

本制品采用了世界最先进的 Directional Topoisomerase Cloning(定向拓扑异构酶克隆技术)可以在 5 分钟内将待表达目的基因(高保真酶扩增的平末端片段)一步法定向克隆到 Gateway 入门载体(Entry vector), 得到的入门克隆(Entry clone)可以和各种 Gateway 目的载体(Destination vector)通过 LR 重组反应, 生成表达克隆(Expression clone)。方便目的基因在原核/哺乳动物细胞/酵母/昆虫表达系统切换表达。

1. 简单快速, 加入待表达基因片段室温仅需 5 分钟便可完成入门克隆构建。
2. 定向克隆技术, 超过 90% 插入为正确方向插入, 减少克隆筛选耗费的时间。
3. 本载体不含原核表达 Shine-Dalgarno(SD) 序列, 因此构建原核表达克隆时应选择带 SD 序列的目的载体进行 LR 重组。也可在设计的时候, 在目的片段前自带 SD 序列。

测序可以采用 M13F/M13R 通用引物测序(见后面图谱)。

**操作步骤:**

#### 1. 待表达目的基因扩增引物设计原则:

- 1) 为了达到定向克隆的目的, 上游引物 5' 端应该加上额外的 4 个碱基 CACC, 这样 PCR 产物的 5' 端可以和载体上突出的 GTGG 互补配对, 从而达到定向克隆的目的。

**举例:**

待表达序列: 5'-ATG GGA TCT GAT AAA ...

设计上游引物: 5'-CACC ATG GGA TCT GAT AAA ...

- 2) 如果不计划和载体 C 端融合表达, 则下游引物的起始端应该加上终止密码子(密码子序列应该为反向互补序列, 例如终止密码子是 TGA, 那么下游引物起始为 TCA)
- 3) 如计划和载体 C 端融合表达, 则下游引物的起始端应该不包含终止密码子; 为达到定向克隆的目的, 下游引物 5' 起始应该不包含 CACC, 这样可以避免 PCR 产物的 3' 端也可以和载体上突出的 GTGG 互补配对而造成错误方向的插入。

#### 2. 连接反应的准备:

PCR 引物不能磷酸化。使用扩增产物是平末端的高保真聚合酶系列扩增(如 Pfu、Vent、Kod、Phusion DNA Polymerase)。PCR 产物建议琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收(货号: DR201)。

#### 3. 连接反应:

- 1) 室温(20°C-30°C)按照如下体系操作(10μL 体系):

Components	Volume
纯化后的 PCR 产物	0.5-8μL
pTOPO-ENTR/D 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(20°C-30°C)进行。

不同大小插入片段的推荐用量：

插入片段大小(bp)	最佳用量(ng)
100-1000	20-40
1000-2000	30-70
2000-5000	40-100

2) 室温(20°C-30°C)连接 5 分钟。

**注：** 本载体推荐室温 5 分钟完成连接，但在很多情况下连接 2-3 分钟已经可以得到足够多的转化子。

3) 连接产物可直接转化克隆感受态细胞(如 DH5a, TOP10 等)或贮存于-20°C。

**注：** 如尚未准备好感受态细胞，可以将连接产物短时间置于冰上备用。

#### 4. 转化：

1) 50-100μL 感受态细胞，置于室温解冻，完全解冻后(约 1 分钟左右)轻弹几次将细胞均匀悬浮。

2) 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)，轻轻混匀，室温放置 5 分钟。

**注：** 根据我们的经验，本公司载体使用商品化的感受态细胞不需要冰浴和热休克、室温放置 5 分钟便可获得足够多转化子，如果实验室自制感受态细胞或者效率较低时，可以按照标准程序进行。

3) 加 300-500μL LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素)，37°C 180rpm 振荡培养 60 分钟。

**注：** 根据我们的经验，一般可以直接将培养基(事先平衡至室温)加入感受态细胞的 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。

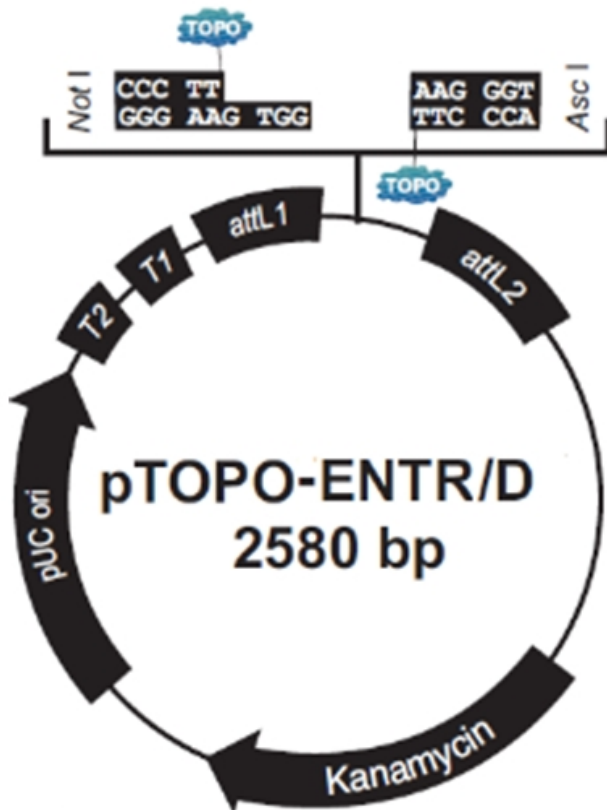
4) 取 200μL 菌液涂板，培养过夜(如果预计转化子少，为得到较多克隆，4000rpm 离心 1 min，吸弃掉部分上清，保留 100-150μL，轻弹悬浮菌体，取全部菌液涂板)

#### 5. 转化子的筛选鉴定：

1) 菌落 PCR 检测/提取质粒内切酶酶切鉴定阳性克隆。

2) 用 M13 通用引物测序，来确定是否含有目的克隆。

pTOPO-ENTR/D 载体图谱：



*rrmB* T2 transcription termination sequence: bases 268-295  
*rrmB* T1 transcription termination sequence: bases 427-470  
M13 forward (-20) priming site: bases 537-552  
*attL1*: bases 569-668 (c)  
TOPO recognition site 1: bases 680-684  
Overhang: bases 685-688  
TOPO recognition site 2: bases 689-693  
*attL2*: bases 705-804  
T7 Promoter/priming site: bases 821-840 (c)  
M13 reverse priming site: bases 845-861  
Kanamycin resistance gene: bases 974-1783  
pUC origin: bases 1904-2577

(c) = complementary sequence

pTOPO-ENTR/D 载体通用测序引物序列:

M13F: CTGTAAAACGACGGCCAG

M13R: CAGGAAACAGCTATGAC

pTOPO-ENTR/D 载体克隆位点序列:

