GNM pTO快速克隆试剂盒

贮存 -20℃保存 12 个月，避免反复冻融

概述：GNM 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。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	KL04920	KL04926
2×pTO Mix (每 5ul Mix 含 30ng 载体 pTO)	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 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×pTO 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 0.5-1ul 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℃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

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。

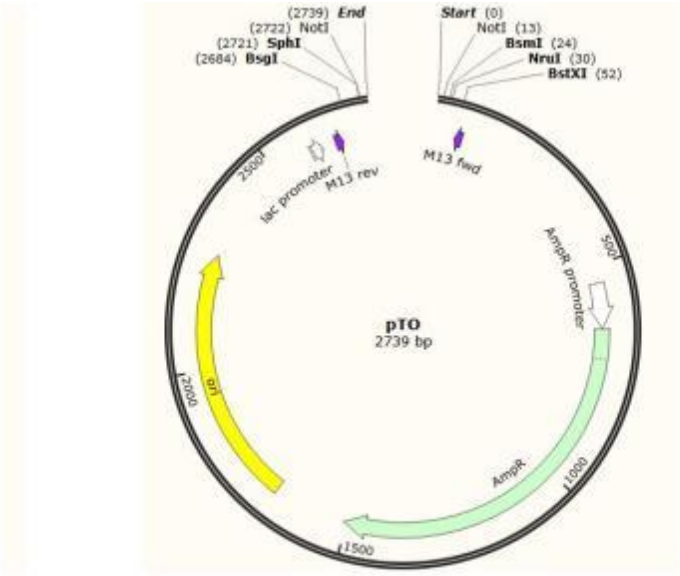
测序：用 M13F 和 M13R 对阳性克隆的质粒进行测序分析。

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>5×10^7 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℃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



M13 rev

CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGCTTGCACGCCTCTGCACTCGTCGG

Cloning site

TCCCGGCATGCGGCCGCGTGTCGCCCTTNNNNAAGGGCGACACGCGGCCGCCGACGCAT

TCGCGAAGTACCGATCTCCAATTCACTGGCCGTCGTTTTAC

M13 fwd

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其他用途。