

版本号:160128

pTOPO-ENTR/D Directional Cloning Kit**pTOPO-ENTR/D 5 分钟定向 Gateway 入门克隆构建试剂盒**

目录号: CV20

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	20 次(CV2001)
pTOPO-ENTR/D Vector(30ng/μl)	20 μl
10 × Enhancer	20 μl

—20℃ 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产物建议胶回收纯化（货号：DR01）。

3. 连接反应:

1) 室温（20℃-30℃）按照如下体系操作（10μl 体系）:

纯化后的 PCR 产物	0.5-8μl
pTOPO-ENTR/D Vector	1μl
10 × Enhancer	1μl
灭菌水	Xμl
<hr/>	
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℃-30℃）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℃-30℃）连接 5 分钟。

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℃。

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。

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℃ 180 rpm 振荡培养 60 分钟。

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 1.5 ml 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 200 μ l 菌液涂板，培养过夜（如果预计转化子少，为得到较多克隆，4000 rpm 离心 1 min，吸弃掉部分上清，保留 100-150 μ l，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

*attL*1: bases 569-668 (c)

TOPO recognition site 1: bases 680-684

Overhang: bases 685-688

TOPO recognition site 2: bases 689-693

*attL*2: bases 705-804

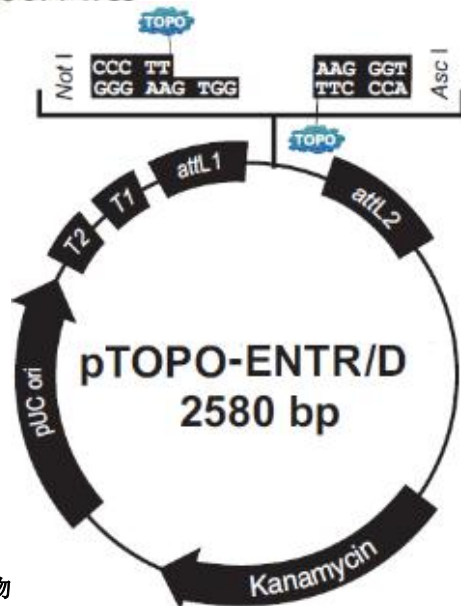
T7 Promoter/priming site: bases 821-840 (c)

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

M13F: CTGTA AACGACGGCCAG

M13R: CAGGAAACAGCTATGAC

❖ pTOPO-ENTR/D 载体克隆位点序列:

```

501 TAACGCTAGC ATGGATGTTT TCCCAGTAC GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTCTTAAGC TCGGGCCCCA AATPAATGATT
                                     M13 forward (-20) priming site

581 TTATTTTGGAC TGATAGTGAC CTGTTTCGTTG CAACAAATTG ATGAGCAATG CTTTTTTATA ATGCCAACT TTG TAC AAA
                                     NotI
                                     AscI
                                     AAC ATG TTT
                                     Leu Tyr Lys

659 AAA GCA GGC TCC GCG GCC GCC CCC TTC ACC ATG ... AAG GGT GGG CGC GCC GAC CCA GCT TTC TTG
      TTT CGT CCG AGG CCG CGG GGG AAG TGG TAC ... TTC CCA CCC GCG CGG CTG GGT CGA AAG AAC
      Lys Ala Gly Ser Ala Ala Ala Pro Phe Thr G TGG Lys Gly Gly Arg Ala Asp Pro Ala Phe Leu
                                     NotI
                                     ascII

719 TAC AAAGTTGGC ATTATAAGAA AGCATTTGCTT ATCAATTTGT TGCAACGAAC AGGTCACCTAT CAGTCAAAAT AAAATCATTTA
      ATG
      Tyr
      T7 promoter/ priming site
      M13 reverse priming site

801 TTTGCCATCC AGCTGATATC CCTATAGTG AGTCGTATTA CATGGTCATA GCTGTTTCCCT GGCAGCTCTG
  
```