

M5 pTOPO- ENTR/D 定向 Gateway 入门克隆构建试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 pTOPO- ENTR/D 定向 Gateway Kit	20T	MF130-01
M5 pTOPO- ENTR/D 定向 Gateway Kit	4x20T	MF130-04

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 12 个月。

【产品简介】

本制品采用了 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。超过 90% 插入为正确方向插入，减少克隆筛选耗费的时间。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）。

【产品组分】

组分名称	20 T	4x20 T
pTOPO-ENTR/D Vector(30ng/μl)	20 μl	80 μl
10x Enhancer	20 μl	80 μl

【引物设计】

- 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 ...
- 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）。
- 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。

【连接反应】

- 连接前准备：** 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 X5 超保真酶或 mix，聚合美货号 MF947/MF743）。PCR 产物建议胶回收纯化（货号：聚合美 MF029-01）。
- 室温（20°C -30°C）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
10x Enhancer	1μl
ddH ₂ O	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

3. 室温（20°C-30°C）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。
4. 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。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。

【转化及菌落 PCR 检测】

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 180 rpm 振荡培养 60 分钟。

根据经验，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。

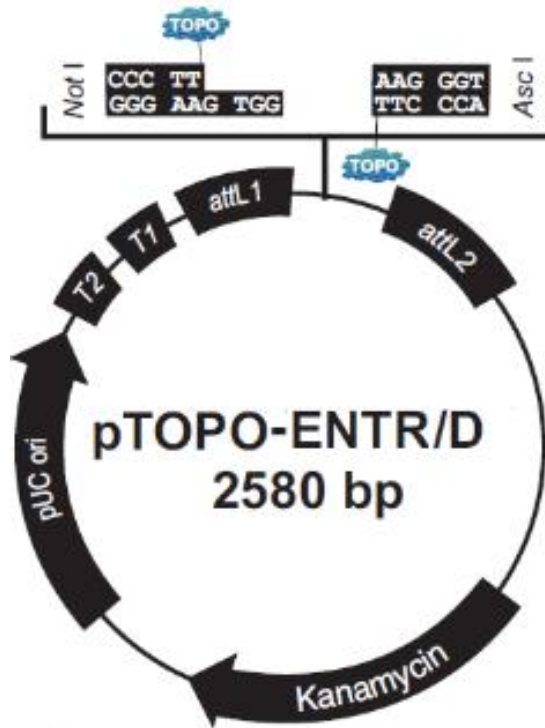
4. 取 200µl 菌液涂板，培养过夜（如果预计转化子少，为得到较多克隆，4000 rpm 离心 1 min，吸弃掉部分上清，保留 100-150µl，轻弹悬浮菌体，取全部菌液涂板）。
5. 菌落 PCR 检测/提取质粒内切酶酶切鉴定阳性克隆。用 M13 通用引物测序，来确定是否含有目的克隆。

【pTOPO-ENTR/D 载体通用测序引物序列：】

M13F: CTGTA AACGACGGCCAG

M13R: CAGGAAACAGCTATGAC

【pTOPO-ENTR/D 载体图谱】



rrnB T2 transcription termination sequence: bases 268-295
rrnB T1 transcription termination sequence: bases 427-470
 M13 forward (-20) priming site: bases 537-552
attL1: bases 569-669 (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 载体克隆位点序列:

```

501 TAACGCTAGC ATGATGTTT TCCAGTAC GACGTTGTA AACGACGGC AGTCTTAAGC TCGGGCCCA AATAATGATT
                                     M13 forward (-20) priming site
581 TTATTTTGGAC TGATAGTGAC CTGTTTCGTTG CAACCAATTG ATGAGCAATG CTTTTTTTATA ATGCCAACT TTG TAC AAA
                                     atll 1
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 CGC 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                               Lys Gly Gly Arg Ala Asp Pro Ala Phe Leu
                                     atll 2
719 TAC AAAAGTTGGC ATTATTAAGAA AGCATTTGCTT ATCAATTTTGT TGCACAAGAAC AGGTCACCTAT CAGTCAAAAT AAAATCATTTA
    ATG
    Tyr
801 TTTGGCCATCC AGCTGATATC CCTATATAGTG AGTCGATTTA CATGGTCATA GCTGTTTCCCT GGCAGCTCTCG
                                     T7 promoter/ priming site
                                     M13 reverse priming site
    
```


【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。