

Superbrilliant[®] pUC57 平黏端通用 TOPO 克隆载体Superbrilliant[®] pUC57 Simple TOPO Cloning Vector

Cat.No. ZS-M16001

编号	组分	ZS-M16001S	ZS-M16001M
		(20T)	(50T)
103038	pUC57 Simple Vector(5 ng/μl)	20 μl	50 μl
103039	M13F(-47) (10 μM)	100 μl	250 μl
103040	M13R(-48) (10 μM)	100 μl	250 μl

储存: -20℃可保存 2 年, -80℃可保存 5 年, 避免反复冻融。

简介: pUC57 Simple 通用克隆载体采用了 TOPO 酶连接技术, 载体预先偶联上 TOPO 酶, 当加入 PCR 扩增产物后, 5 min 就可以完成连接反应, 连接阳性率高。pUC57 Simple 通用克隆载体消除了大部分的常用酶切位点, 便于后续亚克隆。该产品适用于 Taq 酶扩增的含“A”尾巴和高保真酶扩增的 PCR 产物的连接, 载体含有氨苄青霉素抗性筛选标记。

产品特点

- (1) 快速连接, 最快仅需 5min;
- (2) 操作简单, 仅需加入载体和片段即可;
- (3) 无需蓝白斑筛选, 阳性率高;
- (4) 不包含任何酶切位点, 便于后续亚克隆;
- (5) 平末端和 A 尾产物通用。

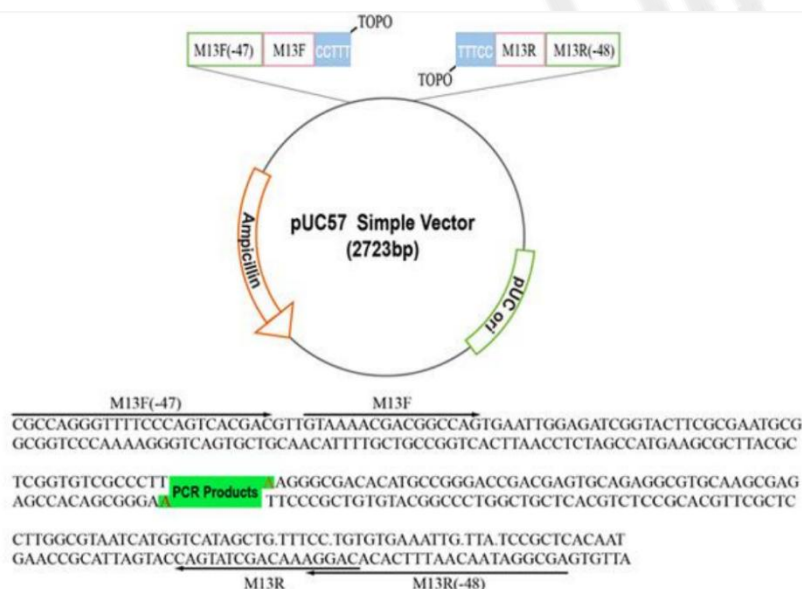
注意: 引物不能磷酸化。

测序引物

正向测序引物: M13F(-47): 5'- CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3';

反向测序引物: M13R(-48): 5'- AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-3';

pUC57 Simple TA/平端通用克隆载体图谱



操作方法

注意：使用此载体，无需蓝白斑筛选，在准备 LB 琼脂平板时无需加入 X-Gal。

1. PCR 产物的纯化

1.1 PCR 扩增完毕后，电泳检测产物，如无非特异性扩增、无引物二聚体、条带单一明亮，则可采用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后用于连接。产物不经纯化也可以进行连接，但效果稍差一些。

1.2 PCR 扩增完毕后，电泳检测产物，如有非特异性扩增条带或引物二聚体，则必须采用胶回收后用于连接。

1.3 PCR 扩增模板来源于 Amp 抗性质粒，则必须采用胶回收后用于连接。

2. PCR 用量和连接时间

PCR 产物大小	PCR 产物用量	载体用量	摩尔比	连接时间	阳性率
0.1~1 kb	2~10 ng	1 μ l	1: 5~10	5~10 min	>95%
1~3 kb	10~20 ng	1 μ l	1: 5~10	15~20 min	>90%
>3 kb	5 ng/kb	1 μ l	1: 5~10	30 min	>85%

3. 连接反应

向 0.2 ml EP 管中依次加入如下试剂

成 分	用 量
PCR 产物	0.5~4 μ l (用量参考上表)
pUC57 Simple Vector	1 μ l
加无菌水至总体积为	5 μ l

轻轻吹打混合均匀后, 室温 (25°C) 孵育 5~30 min, 通常放置 10 min。

关于 PCR 产物的用量说明: 在 PCR 产物回收后 (在无法进行 NanoDrop 测定浓度的情况下), 按照一般的经验可估算产物的用量, 原则为: 3 μ l 回收产物在琼脂糖凝胶电泳后, 可清晰判断的情况下, 使用 0.5~1 μ l 回收产物 (约 5~15 ng) 进行连接即可。回收产物难以观察的情况下使用 4 μ l 回收产物 (约 5~10 ng) 进行连接。使用过高量的 PCR 产物将会导致连接效率低下, 长斑数量和阳性率急剧下降。

4. 转化

4.1 取 5-10 μ l 上一步骤的反应样品加入到 50-100 μ l DH5 α 等感受态细胞中 (注意所加入的 DNA 样品体积不要超过感受态体积的 1/10), 轻轻混匀, 将该混合物置于冰上 30 min。

4.2 42°C 水浴中 90 秒进行热激, 然后迅速放回冰浴中, 静置 3~5 min。

4.3 加入 500 μ l 不含抗生素的 SOC 或 LB 培养液, 轻轻混匀, 37°C 震荡培养 1h。

4.4 将菌液 5000 rpm 离心 1 min 以沉淀菌体。吸去大部分培养液, 剩余约 50-100

μl 的培养液，重悬菌体。然后全部均匀涂布到含适当抗生素的 LB 平板上，37℃ 培养箱中培养过夜。

4.5 第二天挑取平板上的克隆进行菌落 PCR 或者提取质粒进行酶切鉴定，也可以挑取至少 3 个克隆进行测序验证。

5. PCR 菌检挑选阳性克隆菌落(连接产物条带单一、清晰情况下，阳性率>95%，可无需菌检，直接测序，本步骤可省略)

5.1 用 10 μl Tip 头挑取生长良好的单个菌斑，放置于 10 μl 无菌水中吹打几次混合均匀。

5.2 取 1 μl 上述菌液于 20 μl PCR 体系中，用 PCR 特异性引物或者 M13F(-47)和 M13R(-48)鉴定阳性克隆。

PCR 反应体系

反应体系	用量
5XEfficient Taq PCR Master Mix (with Dye)	4 μl
M13F(-47) (10 μM)	1 μl
M13R(-48) (10 μM)	1 μl
菌液模板	1 μl
灭菌双蒸水	13 μl

PCR 反应条件

	温度	时间
变性	95℃	30 s
循环 25~30	95℃	10 s
	58℃	20 s
	72℃	2kb/min
	72℃	2 min

5.3 以上述菌液为模板进行 PCR 扩增，并电泳检测(如载体自连接，则菌检 PCR 扩增长度为：140 bp)。

6. 质粒提取及测序

将鉴定为阳性的菌液接种于 5 ml LB 培养基中（含 100 ug/ml 氨苄青霉素），37°C 振荡（225 rpm）培养过夜，提取质粒。并使用 M13F(-47)或 M13R(-48) 进行测序。

7. 常见问题及分析

7.1 问题：平板克隆数少或不长斑 原因：通常是由于感受态效价较低造成，更换感受态可解决问题。平板为 100 µg/ml 氨苄青霉素抗生素，检查是否用错。

7.2 问题：阳性率低 原因：连接 PCR 产物有引物二聚体、连接产物条带不明亮（浓度不够）。

7.3 问题：鉴定条带大小与预期不符 原因：PCR 产物在回收过程中发生断裂，造成小片段产物，在连接大片段时尤其严重。菌检产物大小为 140 bp+目标产物 大小，如插入片段为 500 bp，则菌检阳性克隆为 640 bp。

7.4 问题：提取的质粒是否能进行酶切鉴定 回答：该载体上不携带任何常规酶切位点，除非产物自带酶切位点，否则不能酶切鉴定。