

描述: 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。

组分

组分	D2401(20T)	D2402 (20T)
pUC57 Simple Vector(5 ng/μl)	20 μl	10 μl
M13F(-47) (10 μM)	100 μl	100 μl
M13R(-48) (10 μM)	100 μl	100 μl
RTS DH5α 冻干感受态	2 瓶	无
Nano E.coli Transfection Reagent	1ml	无

注意: RTS DH5α 冻干感受态在未溶解状态下, 可于-20°C长期保存 (>2年), 已经溶解后, 请-60°C以下保存 (3个月)。

主要特征

(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。

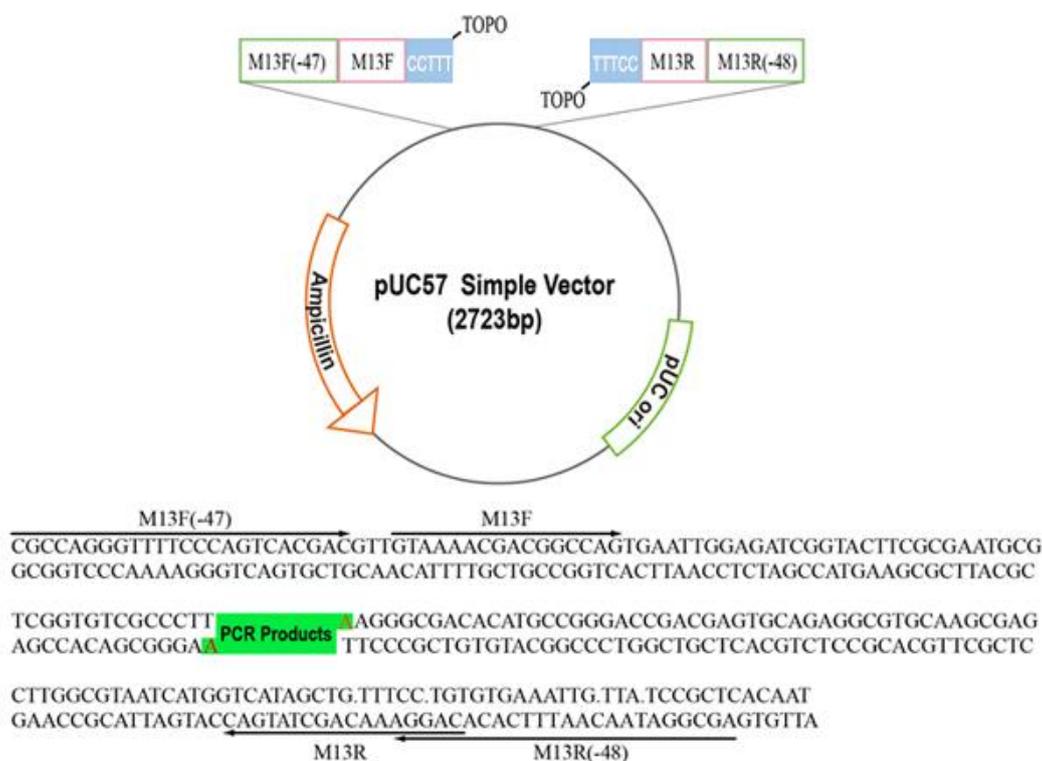
注意: 引物不能磷酸化。

测序引物

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

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

pUC57 Simple TA/平端通用克隆载体图谱



操作步骤

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
0.1~1kb	2~10ng	1 μ l	1: 5~10	5~10min	>95%
1~3kb	10~20ng	1 μ l	1: 5~10	15~20min	>90%
>3kb	5ng/kb	1 μ l	1: 5~10	30min	>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 5~30min，通常放置 10min。

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。使用过高的量的 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(以 RTS DH5 α 克隆感受态细胞为例说明)

4.1 从 -20°C 冰箱中取出 Nano E.coli Transfection Reagent 彻底融化，放置于冰上。取 300 μ l Nano E.coli Transfection Reagent 加入到一支冻干感受态细胞中，并分装到 10 支 1.5 ml EP 管中（每支 30 μ l），于 -60°C 以下保存（或立即使用）。

4.2 将 5 μ l 连接产物加入到分装的感受态细胞中，轻弹 EP 管（或枪头轻轻吹打），置于冰上 15 min。

注意：放置时间不要超过 30 min，过长时间会导致核酸聚合，从而影响转化效率。

4.3 置于 42°C 热激 1min 后，迅速置于冰上急冷 2 min。

4.4 热激完毕后，向上述感受态细胞中加入 450 μ l 不含抗生素的 SOC（或 LB）培养基，37°C 振荡（225 rpm）培养 60 min。使质粒上抗性标记基因表达，菌体复苏。

4.5 取 200 μ l 复苏菌液涂布到含相应抗生素的 LB 琼脂平板表面。

4.6 将平板置于 37°C 培养，12~18 小时后可出现菌落。

注意：如使用液体感受态，直接将 5 μ l 连接后产物加入到液体感受态，并参照液体感受态操作方法即可。

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 μ l Tip 头挑取生长良好的单个菌斑，放置于 10 μ l 无菌水中吹打几次混合均匀。
- 5.2 取 1 μ l 上述菌液于 20 μ l PCR 体系中，用 PCR 特异性引物或者 M13F(-47)和 M13R(-48)鉴定阳性克隆。
- 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：140bp）。

PCR 反应体系

反应体系	用量
5XSuper Taq PCR Mix(with Dye)	4 μ l
M13F(-47) (10 μ M)	1 μ l
M13R(-48) (10 μ M)	1 μ l
菌液模板	1 μ l
灭菌双蒸水	13 μ l

PCR 反应条件

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

6. 质粒提取及测序

将鉴定为阳性的菌液接种于 5ml LB 培养基中（含 100 μ g/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率较低造成，更换感受态可解决问题。平板为 100 μ g/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 140bp+目标产物大小，如插入片段为 500bp，则菌检阳性克隆为 640bp。

（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。