

Technical literature is available at: www.mesgenbio.com. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com

MESGEN[™]
INNOVATION BIOTECHNOLOGY

产品包装: 20 tests / 100 tests

产品简介

本试剂盒适用于克隆带有3'-末端A突出的PCR产物的克隆。

本pUCm-T载体是为简化PCR产物的克隆而设计的。许多高温DNA聚合酶, 如*Taq* DNA聚合酶、*Tth* DNA聚合酶等扩增的PCR产物在3'-末端后都带有一个突出的碱基A, 这样的PCR产物可以用3'-末端后带有一个突出碱基T的载体方便地进行克隆。

MesGen生产的pUCm-T是一种新颖的pUC系列T载体, 其多克隆位点更多的单切点和b-半乳糖苷酶阅读框架的调整大大方便了克隆的蓝/白筛选。插入位点两端独特设计的两个*Pst*I 位点使插入片段可以用*Pst*I 单酶切进行检测, 也可以用非常廉价而高效的*Eco*R I和*Hind* III双酶切进行检测。可以用M13通用引物和T7启动子引物对PCR产物进行测序。pUCm-T含有T7 RNA聚合酶的启动子, 可以对插入片段进行体外转录。

产品组成

| 组分 | 20次 |
|-------------------------------|-------|
| pUCm-T Vector | 1 µg |
| 10×Ligation Buffer | 50 µl |
| PEG Buffer | 50 µl |
| T4 DNA Ligase | 20 µl |
| Sterilized ddH ₂ O | 1 ml |

实验准备

1. PCR产物3'末端带有突出的A碱基: *Taq*、*Tth*、*AmpliTaq*、*KlenTaq* DNA聚合酶扩增的PCR产物3'末端均带有突出的A碱基。建议扩增的PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳进行回收, 再进行连接转化实验, 可以使用迈基产品柱式DNA胶回收试剂盒 (MDE6500)。如果PCR扩增产物特异性很高, 可直接使用迈基产品柱式PCR产物纯化试剂盒 (MDU4000) 纯化PCR产物。
2. PCR产物3'末端没有突出的A碱基: *Pfu*、*Pwo*、*Tli*或*DeepVent* 等DNA聚合酶具有3' 5'外切酶活性, 其扩增的PCR产物末端可能不带有3' A, 要对这种平末端PCR产物进行克隆, 应先对其进行3'末端加A, 再进行连接转化实验。建议进行加A实验。
3. 自备试剂: SOC培养基、IPTG、X-gal等。

操作步骤

1. 在0.2 ml PCR管中配制下列连接体系

| 反应组分 | 10 μ l 反应体系 |
|-------------------------------|----------------------|
| 插入的目的片段 | X μ l (0.2 pmol) |
| pUCm-T Vector | 1 μ l (50 ng) |
| 10 \times Ligation Buffer | 1 μ l |
| PEG Buffer | 1 μ l |
| T4 DNA Ligase | 1 μ l |
| Sterilized ddH ₂ O | 补足至10 μ l |

一般最后加入T4 DNA Ligase

2. 16 $^{\circ}$ C连接1~12 h。

✓ 为了达到最佳连接效果，建议16 $^{\circ}$ C连接过夜。

3. 将100 μ l感受态细胞置于冰上解冻后，加入上述10 μ l连接液，轻轻混匀，冰上放置30 min。

✓ 可选用一步法制备感受态细胞（迈基货号MCK9875）快速制备感受态细胞。

4. 42 $^{\circ}$ C水浴热激90 sec，再冰上放置5 min。

5. 加入900 μ l SOC培养基，37 $^{\circ}$ C振荡培养1 h。

6. 4000 rpm离心3 min，用枪头吸掉750 μ l上清液，用剩余的培养基将细胞悬浮。

7. 将细菌悬液均匀涂布在含20 μ l IPTG (100 mM) 和100 μ l X-gal (20 mg/ml) 的氨苄青霉素抗性的LB平板上。

✓ 涂布菌液的用量可以根据连接的效率及感受态细胞的转化效率而进行适当的调整。

8. 将平板于37 $^{\circ}$ C培养1 h，然后倒置培养过夜。

✓ 先将平板正向放置1 小时，以吸收过多的液体。

9. 用牙签挑取白色菌落，以M13通用引物或基因特异性引物进行PCR扩增，确认载体中插入片段的长度大小。
或将白色菌落挑至含氨苄青霉素的液体培养基中37 $^{\circ}$ C培养过夜，提取质粒后进行酶切鉴定。

储存条件

保存于-20 $^{\circ}$ C。

仅供科学研究，不得用于临床诊断、治疗