

版本号：03/2015

pUC-T Quick Ligation Kit

pUC-T TA快速连接试剂盒（含载体，连接酶）

目录号：YJ2591

保存条件：-20℃保存。

组分说明

| | |
|----------------------------------|--------|
| Cat. No. | YJ2591 |
| Size | 20次 |
| pUC-T (50 ng/μl) | 20 μl |
| Conctrol Insert (50 ng/μl) | 10 μl |
| Quick T4 DNA Ligase | 20 μl |
| 2×Quick Ligation Reaction Buffer | 120 μl |

产品简介

pUC-T TA载体是一种高效克隆PCR产物的专用载体，它是由pUC18载体在EcoR V酶切位点处切开，在两侧的3'端添加T而成。由于大部分耐热聚合酶反应时都会在 PCR产物的3'端添加一个A，它可以与pUC-T 3'端的T互补连接，因此可大大提高PCR产物的连接和克隆效率。

试剂盒中配备高效率的T4 DNA Ligase和为快速高效DNA连接优化的2×Quick Ligation Reaction Buffer。连接效率相当于用T4 DNA Ligase 进行常规连接1小时。带有插入片段的重组子可根据 α 互补原理，进行蓝白斑筛选，判断载体中有无外源基因的插入。克隆后可以用BcaBEST Sequencing Primers和 M13通用引物对PCR产物进行测序。

注意事项

1. Insert DNA 要求

- 1) 连接使用的PCR片段3'末端应带有“A”尾。有些高保真DNA聚合酶，如我公司的Pfu扩增的PCR产物是平滑末端，可使用加A试剂盒加上A尾后，再进行T载体克隆。
- 2) PCR产物建议进行切胶回收纯化后再进行T载体克隆，以免PCR产物中的非特异片段或残存引物等杂质影响。推荐使用 YJ2302/YJ0524/YJ0518 快速琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒。

2. 连接反应要求

- 1) 本试剂盒能使大多数连接反应在25℃条件下5分钟甚至更短时间内达到反应终点，增加反应时间反应效率不会增强。如用快速连接反应 1小时后，转化效率会明显降低；如25℃快速连接反应过夜，则转化效率会下降到75%。
- 2) 2×Quick Ligation Reaction Buffer含有ATP，使用前置于冰上使其融化后充分混匀，建议初次使用分装成小管冻存，避免其反复冻融影响DNA连接效率。
- 3) 由于T4 DNA Ligase中含有甘油，比较粘稠容易挂壁，建议使用之前短暂离心将液体收集到管底，取样时枪头尽量不要深入液面太深，以免粘在枪头上造成损失。
- 4) 如快速连接产物用于电转，因快速连接反应体系中的PEG会影响电转效率，建议使用离心柱将连接产物进行DNA纯化（如YJ2301快速DNA产物纯化试剂盒）后再进行电转。

3. 感受态细胞要求

建议使用高效的热击转化感受态细胞，这样才可能得到比较理想的阳性克隆，如需进行蓝白斑筛选，宿主细胞必须具有正确的基因型（F'编码的【lacZ Δ M15】）产生 ω 片段，才能与载体DNA产生的LacZ α 多肽结合，表现出 β -半乳糖苷酶活性（ α 互补）。pUC-T TA载体以pUC18载体为基础构建而成，因此，适合pUC18载体的感受态细胞都可以使用。推荐使用本公司YJ0807 TOP10感受态细胞、YJ0808 DH5 α 感受态细胞。

4. 阳性克隆筛选

阳性DNA片段成功插入至pUC-T Vector中后，一般情况下 β -半乳糖苷酶的表达将受到破坏，重组克隆体在含有X-Gal、IPTG、Amp的LB固体培养基上培养时将显示白色菌落。但有时比较短的DNA片段插入载体时，基因的读码框有可能正好与LacZ的读码框相吻合，克隆体也会显示蓝色菌落。

5. 阳性对照

为了确认实验操作的正确性，以及实验试剂的有效性，我们建议使用本试剂盒中配备的Control Insert（750 bp）进行阳性对照实验。

使用方法

1. 按以下体系配制反应液：

| 成分 | 反应体系 | 对照体系 |
|----------------------------------|----------------|----------------|
| pUC-T | 1 μ l | 1 μ l |
| DNA插入片段 * | 0.1 -0.3 pmol | -- |
| Control Insert DNA | -- | 1 μ l |
| 2×Quick Ligation Reaction Buffer | 5 μ l | 5 μ l |
| Quick T4 DNA Ligase | 1 μ l | 1 μ l |
| RNase-Free Water | 补足至 10 μ l | 补足至 10 μ l |

*Insert DNA的使用量：在进行克隆时，Vector DNA和Insert DNA的摩尔比一般为：1:2-1:10，可根据实验情况选择适当的Vector DNA和Insert DNA的摩尔数比。Insert DNA的使用量=nmol数 \times 660 \times Insert DNA bp数。本载体1 ml（50 ng）的摩尔数约为0.03 pmol。

2. 轻轻混合，短暂离心。25℃反应5分钟。

注意：反应时间不要超过15分钟，否则会降低连接效率。

3. 反应结束后，将DNA连接产物存放于0-4℃，而后进行转化实验；也可将DNA连接产物置于-20℃保存。

注意：勿进行加热失活反应。

4. 将连接产物加入50 μ l感受态细胞中（将感受态细胞置于冰上融化），冰浴30分钟。

注意：用化学法转化时，连接产物的加入量不要超过感受态细胞体积的10%。

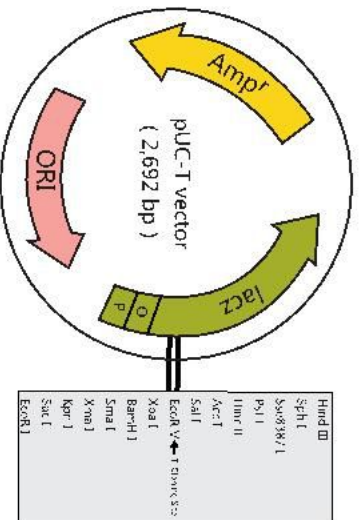
5. 42℃热击45秒钟，迅速将离心管转移到冰浴中，冰上静置2-3分钟。

6. 加入450 μ l无菌SOC或LB培养基，混匀后置于37℃摇床，150 rpm振荡培养45分钟，使菌体复苏。

7. 根据实验要求，取适量已转化的感受态细胞，加到含有X-Gal、IPTG和Amp的LB固体培养基上，用无菌的涂布棒将细胞均匀涂开，将平板置于37℃，直至液体被吸收后，倒置培养，37℃培养12-16小时。

8. 计算白、蓝色菌落，挑选白色菌落，使用PCR法或酶切法鉴定插入片段是否正确。

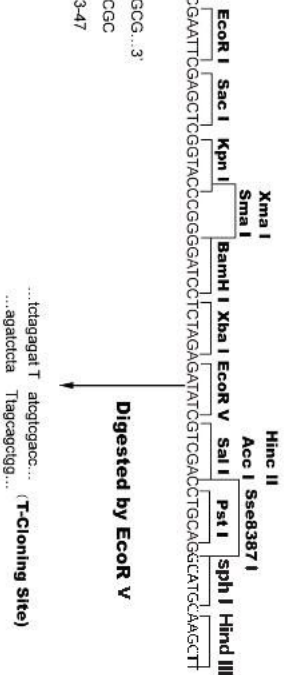
pUC-T载体图谱



pUC-T载体相关位点说明

| 名称 | 坐标 |
|--|-----------|
| Cloning site | 425 |
| BaBEST Sequencing Primer M13-47 binding site | 352-375 |
| BaBEST Sequencing Primer RV-M binding site | 484-507 |
| LacZ operator | 146-475 |
| COLT ori | 873-1461 |
| Amp ^r | 1632-2492 |

BaBEST Sequencing Primer RV-M
 GAGCGATTAACAATTTCACACAGG →
 lacZ →
 5' ... GAGCGGATTAACAATTTCACACAGGAAACAAGCTATGACACATTAACGAAATTTCGAGCTCGGTACCCGGGATTCCTCTAAGAGATATCGTGCACAGCTCAGGCTT
 GGCACTGGCCGCTCGTTTACAAAGCTGTGACTGGGAAAACCCCTGGCC...3'
 → CAGCACTGACCCCTTTTGGGACCCG
 BaBEST Sequencing Primer M13-47



Digested by EcoR V