快速 T 载体连接试剂盒

产品编号	规格
MCT5201-20	20 rxn

保存条件及效期:

−20℃恒温保存一年，−80℃长期保存。蓝冰(市内)或干冰(外埠)运输。

产品描述：

本产品是高效、便利的 PCR 产物克隆专用试剂盒。T Cloning Vectorc 是基于 pBlueScript II SK(+) 质粒，经酶切处理后获得的具有突出的 3′-末端 T 碱基的线性载体，可与 Taq 或 Tth 等 DNA 聚合酶催化的携带 3′-末端 A 碱基的 PCR 产物互补连接，以利于下一步克隆或测序。由 Pfu、Pwo、Vent 或 KOD 等有 3′→5′外切酶活性的 DNA 聚合酶催化反应的 PCR 产物，也可经 Taq 酶添加 3′-A 末端后，与 T Cloning Vector 连接。T Cloning Vector 不含 NdeI 或 NcoI 限制性内切酶位点，故可用于克隆含上述酶切位点的基因。T Cloning Vector 经过严格纯化，3′-末端突出的 T 碱基稳定，载体自连几率低。严格按本说明书操作，0.5~2 kb 插入片段的蓝斑数可低于 5%，白斑插入阳性率可达 90%以上，因此可免蓝白斑筛选。本试剂盒提供 DNA 连接酶和反应缓冲液，25℃ 5 分钟即可完成连接反应；同时提供一份 800 bp PCR 产物(Control Insert)作为连接反应的阳性对照。DNA 测序建议使用 M13 Forward 和 M13 Reverse 或 T7 promoter 和 T3 promoter 通用型引物。

产品组分:

组分	浓度	体积	注意事项
T Cloning Vector	~40ng/μl	20 μl	可耐受至少 10 次的反复冻融；严格无菌操作，避免核酸酶污染
Control Insert	~40ng/μl	5 μl	
T DNA Ligase		12 μl	
2 x Ligation Buffer		300 μl	可耐受至少 5 次的反复冻融；如每次用量少应按需分装

T 载体结构和序列

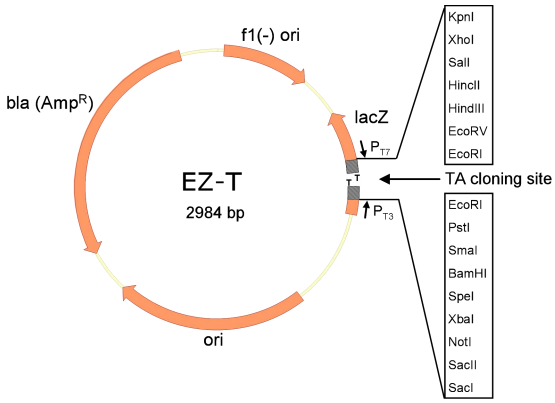


图 1. T 载体环形图谱

M13 Forward Primer (-20) T7 Promoter KpnI XhoI SalI HincII HindIII EcoRV

GTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATAT
CATTTTGCTGCCGGTCACTCGCGCGCATTATGCTGAGTGATATCCCGCTTAACCCATGGCCCGGGGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATTCGAACTATA

EcoRI EcoRI PstI SmaI BamHI SpeI XbaI NotI SacII SacI

CGAATTCCCAATACT PCR product GTATTGGGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTT
GCTTAAGGGTTATG TCATAACCCTTAAGGACGTCGGGCCCCCTAGGTGATCAAGATCTCGCCGGCGGTGGCGCCACCTCGAGGTCGAA

TTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG
AACAAGGGAAATCACTCCCAATTAACGCGCGAACCGCATTAGTACCAGTATCGAC

T3 Promoter -galactosidase- M13 Reverse Primer

图 2. T 载体的多克隆位点区序列。T 载体的 M13 Forward (-20) 和 M13 Reverse 引物之间存在 244 个碱基，T7 promoter 和 T3 promoter 之间存在 187 个碱基。进行菌落 PCR 鉴定时应将上述序列计算在内。

质检标准：

当插入 DNA 对照(800 bp)与载体连接的摩尔比例为 3:1 时，蓝斑率低于 5%，有 90%以上的白色菌落含插入 DNA 对照片段。经测序确认多克隆酶切位点及 T 碱基存在。

使用方法:

A． 克隆含有 3′- A 末端的 PCR 产物

1. PCR 产物的纯化和定量：

1) 切胶回收纯化 PCR 产物。无非特异性条带的 PCR 产物可直接用于连接反应，但阳性率低于纯化的 PCR 产物。

2) 估算 PCR 产物的浓度，按照插入片段与 T 载体的摩尔比为 3~10:1 估算所需 PCR 产物的体积：
插入片段体积(μl) = T 载体量(ng) x 插入片段大小(kb) ÷ T 载体大小(kb) x 插入片段与 T 载体的摩尔比 ÷ 插入片段浓度(ng/μl)
例：浓度为 20 ng/μl 的 500 bp PCR 片段应加体积为 40 ng x 0.5 kb ÷ 3 kb x 3 ÷ 20 ng/μl = 1 μl

2. 连接：

1） 将 2 x Ligation Buffe 于冰中融解后混匀，按下表配制连接反应液：

组分	样品	阳性对照
T Cloning Vector (40 ng/μl)	1 μl	1 μl
PCR Product	1~4 μl	-
Control Insert (40 ng/μl)	-	1 μl
DNA Ligase	0.5 μl	0.5 μl
2 x Ligation Buffer	5 μl	5 μl
Sterilized ddH_2O	定容至 10 μl	2.5 μl

2） 25℃静置 5 分钟。克隆 2 kb 以上片段时，应将反应时间延长至 2 小时以提高连接效率。请勿反应过夜，以防非特异性连接。连接反应液如不立即进行转化，可于-20℃长期保存。

3. 转化：以常规化学转化为例，具体方法请参考所使用感受态细胞的说明书；电转化需首先对连接反应液进行脱盐处理

1） 将感受态细胞置于冰上融解；

2）取 2~5 μl 连接反应液加入至 50 μl 感受态细胞中（连接反应液体积≤10%感受态细胞体积），冰中放置 10~30 分钟；

3） 42℃加热 45~60 秒后，冰中放置 2 分钟；

4） 加入 800 μl SOC 或 LB 培养基，37℃振荡培养 40~60 分钟，使β-内酰胺酶基因表达；

5） 将菌液均匀涂布到含 100 μg/ml 氨苄青霉素（Amp）的 LB 琼脂平板或含 X-gal、IPTG、Amp 的 LB 琼脂平板表面，37℃培养 12~16 小时。

4. 鉴定：

1） 常规鉴定：挑取白色菌落提取质粒，应用电泳、PCR 或酶切等方法确定是否含目的片段。推荐使用我公司的 Lyse Rapid Colony Identification Kit。

2） 菌落 PCR：可选用 M13 Forward 和 M13 Reverse 或 T7 promoter 和 T3 promoter 通用型引物或基因特异性引物进行菌落 PCR。推荐建使用我公司的 2x Taq PCR StarMix 或 PCR Rapid Colony Identification Kit。菌落 PCR 应尽可能设立阳性对照和阴性对照反应。

3） DNA 测序：根据插入片段大小，选用图 2 所示的通用引物或基因特异性引物进行测序鉴定。

B． 克隆平端的 PCR 产物

1． 添加 3′-末端 A 碱基：取 1~7 μl 平端 PCR 产物（切胶回收或过柱纯化后效果更佳），加入 1 μl 10 x Taq PCR buffer、终浓度为 0.2 mM 的 dATP 和 2~5 U 的 Taq DNA Polymerase，用水补至 10 μl，70°C 放置 15~30 分钟后直接进行连接

反应。

2. 连接、转化、鉴定：参见上述操作步骤 A-2 至 A-4。

补充说明：

1. 用本试剂盒做大多数连接反应都能在 25℃ 5 分钟完成，长于这个时间效果会变差，如果 25℃反应过夜，则转化效率能下降到 75%左右。
2. PCR 引物的 5′-末端设计为 G 或 A 更有利于提高 TA 克隆效果。
3. PCR 产物最好经过切胶回收纯化，以提高 TA 克隆的阳性率。未纯化的 PCR 产物由于含有小片段 DNA、残留引物、引物二聚体等，克隆效率低于纯化的 PCR 产物，故鉴定时需多挑取一些菌落。
4. PCR 产物如不立即用于 TA 克隆，可于−20℃保存一至两周。长期保存会造成 3′-A 碱基缺失，影响克隆效率。
5. T Cloning Vector 和 Control Insert 应避免长时间放置于室温状态以及反复冻融，以免 3′-末端突出的碱基丢失。经检测，反复冻融 10 次左右对克隆效果无显著影响。若 T 载体的单次用量小，应予分装。
6. 2 x Ligation Buffer 中由于含有 ATP，不可多次反复冻融或保存于自动除霜的−20℃冰箱内。如果通过对照实验发现该试剂失效，可添加少量 ATP，即可恢复连接酶的活性。
7. 感受态细胞的选择：感受态细胞的转化效率应高于 10^8 cfu/μg DNA。常规可用于蓝白斑筛选的菌株，如 DH5 、JM109、TOP10、XL1-blue 等，均可用于转化。由于本产品阳性率高，可不必进行蓝白斑筛选。如需使用电转化感受态细胞，连接反应产物必须首先经过过柱纯化或乙醇沉淀回收。
8. 经验证明，600 bp 以下的插入片段在没有破坏读码框的情况下也会产生蓝色或淡蓝色的菌落。因此当蓝色菌落过多，同时排除因连接时间过长或核酸酶污染等因素导致载体自连后，也应挑取一些蓝色菌落进行筛选。