

克
必
隆
系
列

CAT#:90801A-20
CAT#:90801B-20
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

一站式 AT 克隆试剂盒

One-Stop AT Cloning Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点	AT克隆就是利用T载体两个3’端各带有一个T突出，而PCR扩增产物两个3’端各带有一个A突出的特点，在DNA连接酶的作用下，将PCR产物克隆到T载体中的过程，它是克隆PCR扩增产物的主要手段。本产品提供了完成AT克隆的所有成份，具有下列特点： 1. 一站式，用户只需要准备PCR产物即可进行AT克隆。 2. T载体由Xcm I酶切方法制备，两个5’端100%含T突出，自连率几乎为零。 3. 克隆效率高，一次AT克隆实验一般能得到上百个重组子。 4. 阳性率高，一般能到90%以上，大大缩短了筛选工作。 5. 提供供两次实验用的对照插入片段，方便分析实验数据。 6. 插入位点两侧有对称的常见酶切位点（如EcoR I），便于对克隆的PCR片段进行近一步的分析。 7. 克隆位点两侧分别有T3和T7 RNA聚合酶启动子，便于用克隆的PCR片段制备RNA探针。 8. 可以使用pUC/M13 Forward和Reverse测序引物测定插入片段的序列。 9. T克隆位点位于β-半乳糖苷酶的α-肽编码区内，可以进行蓝白斑筛选。 10. 含有丝状噬菌体f1 复制起始子，可以制备单链DNA。																										
规格及成分	<table><tr><th>成 份</th><th>编 号</th><th>20 次塑料袋包装</th></tr><tr><td>即用型蓝白 T 载体（50 ng/uL）</td><td></td><td>20 uL</td></tr><tr><td>对照插入片段（50 ng/uL）</td><td></td><td>5 uL</td></tr><tr><td>T4 快速连接缓冲液，2×</td><td></td><td>100 uL</td></tr><tr><td>T4 DNA 连接酶（5 U/uL）</td><td></td><td>30 uL</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>100935</td><td>1 mL</td></tr><tr><td>高效感受态细胞</td><td></td><td>100 uL×10 只(只 B 型有)</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>90801sc</td><td>1 份</td></tr></table>	成 份	编 号	20 次塑料袋包装	即用型蓝白 T 载体（50 ng/uL）		20 uL	对照插入片段（50 ng/uL）		5 uL	T4 快速连接缓冲液，2×		100 uL	T4 DNA 连接酶（5 U/uL）		30 uL	超纯水	100935	1 mL	高效感受态细胞		100 uL×10 只(只 B 型有)	使用手册	90801sc	1 份		
成 份	编 号	20 次塑料袋包装																									
即用型蓝白 T 载体（50 ng/uL）		20 uL																									
对照插入片段（50 ng/uL）		5 uL																									
T4 快速连接缓冲液，2×		100 uL																									
T4 DNA 连接酶（5 U/uL）		30 uL																									
超纯水	100935	1 mL																									
高效感受态细胞		100 uL×10 只(只 B 型有)																									
使用手册	90801sc	1 份																									
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期一年。感受态细胞需要干冰运输，-70℃保存，有效期 6 个月。																										
自备试剂	插入片段																										
使用方法	一： PCR产物的纯化和定量注意事项 1. 由于PCR体系中有大量会抑制DNA连接反应的dATP、还有一些可能在电泳胶上不一定会显示出来的非特异性扩增产物和引物二聚体，所以PCR产物必须用胶回收方法制备才能用于本试剂盒的连接。可以分别使用本公司柱式DNA_{BACK}（CAT#:60202）和PAGE DNA_{back}（包括柱式PAGE DNA_{back}）从琼脂糖胶和PAGE胶上纯化回收PCR片段。具体操作见相关产品使用手册。																										

2. 琼脂糖胶回收的电泳缓冲液最好不要使用TBE缓冲液,因为它会影响DNA的胶回收效率。
3. 为避免UV对DNA的伤害,切胶最好在日光下进行(使用天恩泽基因的绿如蓝染料的话,可以直接在黑色背景下看见DNA条带,不需要紫外光)。如果使用EB或其他染料,必须在紫外下切胶时,最好选择长波(360 nm)紫外灯并以最快速度切胶,文献报道短波UV (300 nm 和240 nm) 会使DNA连接效率降低400多倍。使用短波UV时,可以使用天恩泽基因的DNA防护剂UV Erasol (CAT#: 60601) 减少伤害。
4. PCR片段的体积越小越便于后续操作。洗脱PCR片段时,用最少量的洗脱液洗脱。本试剂盒要求PCR回收片段的浓度最好为50ng/uL。如果浓度不够,最好用醇沉淀法沉淀后直接在管内设置连接反应,也可以使用本公司的核酸浓缩剂 (CAT#: 110801-30) 直接浓缩。
5. 为准确定量回收的PCR产物同时又节约样品,最好使用微量分光光度计(只需用1 uL样品测量)。如果分光光度计需要大量样品,建议使用电泳法定量:将回收的PCR片段与浓度已知的DNA Marker在含EB或绿如蓝染料的琼脂糖凝胶中电泳,通过比较DNA条带的相对荧光强度而估测PCR产物的浓度。

二：连接反应

1. 短暂离心装有蓝白T载体、连接缓冲液和T4 连接酶的离心管。
2. 在三个离心管中加入下列成分(注意,对照可以不做,在出现问题时再做)：

成份	样品管	阳性对照管	自连对照管
T4 快速连接缓冲液, 2×	5 uL	5 uL	5 uL
蓝白 T 载体 (50 ng/uL) (=0.03 pmol/uL)	1 uL	1 uL	1 uL
自备 PCR 纯化产物 (0.03-0.1 pmol/uL)	X uL (见注)	不加	不加
对照插入片段 (50 ng/uL) (=0.06 pmol/uL)	不加	1.5 uL	不加
T4 DNA 连接酶 (5 U/uL)	1-1.5 uL	1-1.5 uL	1-1.5 uL
超纯水	补到 10 uL	补到 10 uL	补到 10 uL

注：如何根据T载体的用量计算PCR纯化片段的最佳用量？

第一：确定插入片段与载体的最佳摩尔比，在本产品的T载体的长度固定（3Kb）时，最佳摩尔比跟插入片段的长度关系如下：

插入片段长度	与载体的摩尔比
1 Kb 以下	2：1 或 3：1

	跟 T 载体接近 (± 1 Kb)	1 : 1
	比 T 载体长 1Kb 或更多	1: 2 或 1: 3
第二: 根据选定的最佳摩尔比按下面方程式计算用量		
$\frac{\text{加入载体的量(ng)} \times \text{插入片段大小(kb)}}{\text{载体大小(kb)}} \times \text{插入片段和载体的摩尔比} = \text{插入片段的量(ng)}$		
本产品提供的T载体长度为3 Kb, 推荐用量为50ng, 如果PCR片段长度为0.5 Kb, 最佳摩尔比设定为3:1, 则其用量为:		
$\frac{50 \text{ ng载体} \times 0.5 \text{ kb插入片段}}{3.0 \text{ kb载体}} \times 3/1 = 25 \text{ ng插入片段}$		
3. 用移液器吹打连接反应液使之混匀, 然后放置在16℃孵育30分钟-过夜。		
4. 65℃5分钟灭活连接酶后直接用于转化或-20℃保存。		
三: 细菌转化及筛选 (仅供参考, 本产品不提供相关试剂)		
1. 将100 μL转化效率在1×10 ⁸ cfu/μg以上的感受态细胞于冰上解冻。		
2. 取5-10 μL连接产物加入到感受态细胞中, 轻轻旋转几次以混匀内容物。		
3. 在冰上放置30分钟。		
4. 将离心管放42℃热休克90秒, 然后快速将其转移到冰浴中放置1~2分钟。		
5. 每管中加900 μL LB培养基, 37℃振荡培养1小时复苏细胞。		
6. 将100uL复苏涂布到含Amp的LB琼脂平板上 (也可加上X-gal和IPTG) 。		
7. 室温4,000 rpm离心剩余的900 uL复苏细胞5分钟, 弃去800 μL上清, 用剩余100 μL培养基重悬细胞并涂布到含Amp的LB琼脂平板上 (可加X-gal、 IPTG) 。		
8. 将平板置于室温直至液体被吸收。此步非常重要, 否则培养板将在37℃排除水分, 细菌将随水在培养基上到处游动, 不能形成单个菌落。		
9. 倒置平皿, 于37℃培养, 12~16小时后可出现菌落。一般情况下阳性对照组总共会有上千个菌落 (100 uL转化液产生的菌落数×10) , 自联对照只有少数几个菌落, 样品组的菌落数取决于PCR回收片段的质量。		
10. 按常规方法筛选重组子。		
MCS 位点	M13 Forward Primer (-20) T7 Promoter KpnI XhoI Sall HincII HindIII EcoRV GTAAACGACGGCCAGTGAAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTGCAACGGTATCGATAGCTTGATATCATTTTGTGTGCGGGTCACTCGCGGCATTATGCTGAGTGATATCCCGCTTAACCCATGGCCCCGGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATTGGAATATA EcoRI EcoRI PstI SmaI BamHI SpeI XbaI NotI SacII SacI CGAATTCCTCAATCT GCTTAAGGGTTATG PCR product GTATTGGGAATTCCTGCGAGCCCGGGGATCCACTAGTTCCTAGAGCGGGCCGCCACCGGGTGGAGCTCCAGCTTTCATAACCCCTTAAGGACGTCGGGCCCCCTAGGTGATCAAGATCTCGCCGGCGGTGGCGCCACCTCGAGGTCGAA TGTTCCTCTTGTAGTGAAGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG AACAAGGGGAATCACTCCCAATTAAAGCGCGGAACCGCATTAGTACCAAGTATCGAC T3 Promoter β-galactosidase-α M13 Reverse Primer	