

版本号: VT151022

pGM-T Fast 克隆试剂盒

本系列产品内容

目录号	产品名称	包装
VT207-01	pGM-T Fast连接试剂盒	20 μ l
VT207-02	(pGM-T Fast Ligation Kit)	60 μ l
VT307-01	pGM-T Fast克隆试剂盒	20 μ l
VT307-02	(pGM-T Fast Cloning Kit with Competent Cell)	60 μ l

产品组成	pGM-T Fast 连接试剂盒		pGM-T Fast 克隆试剂盒	
	VT207-01	VT207-02	VT307-01	VT307-02
pGM-T Fast Vector (50 ng/ μ l)	20 μ l	60 μ l	20 μ l	60 μ l
RapiLigation Mix (2 \times)	100 μ l	3 \times 100 μ l	100 μ l	3 \times 100 μ l
Control Insert DNA(688 bp) (50 ng/ μ l)	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
DH5 α (100 μ l each)	-	-	10 x100 μ l	30 x100 μ l
Compcell Control	-	-	10 μ l	10 μ l
Plasmid pUC19 (0.1 ng/ μ l)	-	-	10 μ l	10 μ l
ddH ₂ O	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

保存条件

感受态细胞需要严格的在-70 $^{\circ}$ C冻存，保质期6个月，其余的试剂可于-20 $^{\circ}$ C保存1年，避免反复冻融。（载体和连接试剂可以适当的分装成小份，防止反复冻融，以保证质量）。

产品简介

pGM-T Fast Vector是基于pGM-T Vector改良的一种高效克隆PCR产物的专用载体，经由克隆质粒在XcmI内切酶酶切后得到的带3' T突出末端的线性化载体，通过该方法产生的带有3' T突出末端的线性化载体效率远高于传统酶切加尾法。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，可与pGM-T Fast Vector 3'端的T互补连接。

试剂盒中配备了新型的RapiLigation Mix（目录号：RT407）为高效的T4 DNA连接酶反应试剂，其中含有连接增强剂、酶稳定剂，可大大缩短连接时间、提高PCR产物的连接和克隆效率。按不同需要配备了DH5 α 感受态细胞以及对照用超螺旋质粒，方便进行转化。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（白色克隆为阳性重组克隆，蓝色的为载体自连的克隆，具体筛选原理参考分子克隆等书籍）。克隆后，可使用通用引物T7、SP6进行鉴定和测序。

产品特点

高效快速： 5 min快速连接，阳性率近100%。

灵敏广泛： 适合低至0.025 pmol浓度片段和长至8 kb片段的高效连接。

操作便捷： 配合使用新型RapiLigation Mix，只需加入载体和片段即可进行连接反应。

不同片段使用量

载体与片段的摩尔比控制在1:3-1:10，请根据凝胶电泳或紫外分光光度计检测后的浓度和片段长度来计算其摩尔比。插入片段用量，可根据以下公式粗略计算：

$$\text{插入片段用量 ng} = (3 \sim 10) \times \frac{\text{插入片段长度}}{\text{载体长度}} \times \text{载体用量 ng}$$

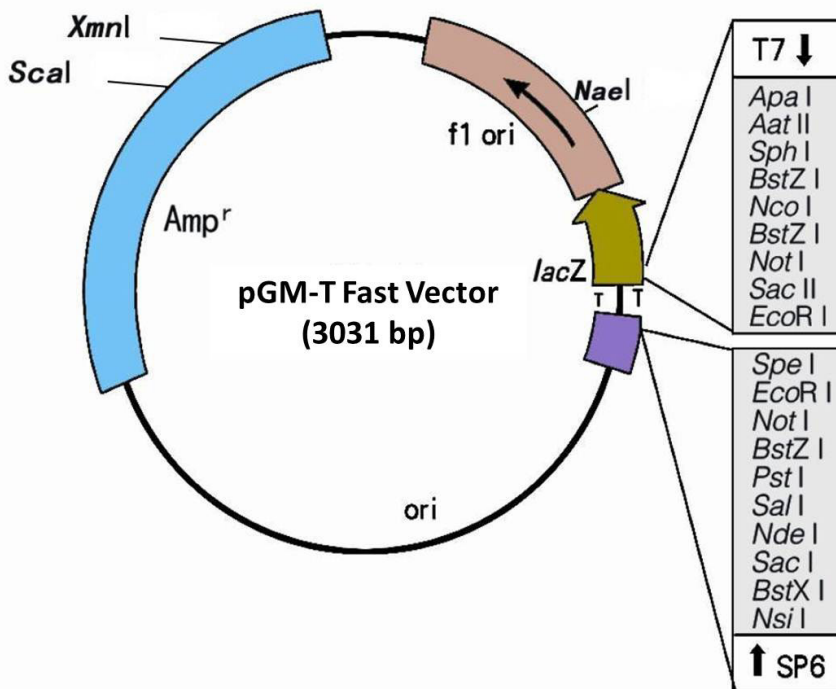
连接体系中50 ng的载体，不同大小的PCR产物最佳加入量举例如下：

PCR产物长度 (bp)	最佳的使用量 (ng)
700 bp	35 ng
2000 bp	100 ng

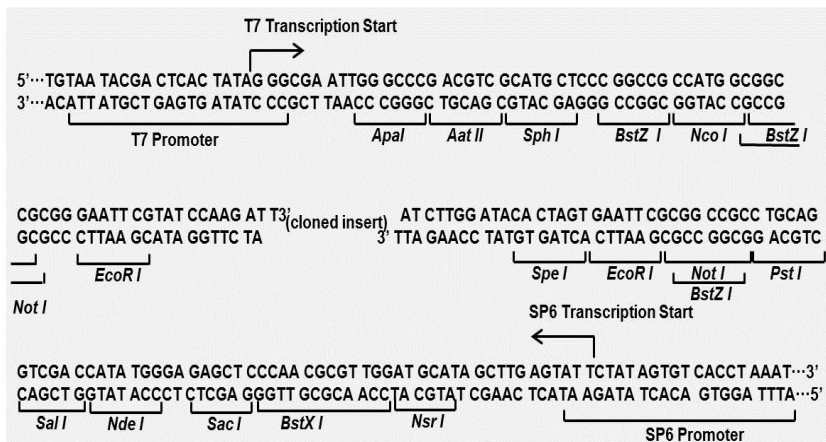
反应体系

标准体系为10 μ l体积，5 μ l的反应体系也能取得很好的效果，试剂用量减半。

pGM-T Fast Vector图谱



pGM-T Fast Vector多克隆位点图



使用方法 (以下的步骤请在无菌条件下操作)

1. 按照下表的内容在无菌的离心管中加入各种成分。

组成成分	体积
RapiLigation Mix (2×)	5 μ l
pGM-T Fast Vector (50 ng/ μ l)	1 μ l
目的PCR片段/ Control Insert DNA	X μ l/1 μ l
ddH ₂ O	补足至10 μ l

2. 轻轻弹动离心管以混匀内容物，短暂离心3-5 sec。将混合反应液置于室温 (22 $^{\circ}$ C) 反应 5 min。反应结束后，将离心管置于冰上，进行后续的转化反应。

注意：如果插入片段长度小于1 kb，反应时间可以采用5 min。

如果插入片段长度为1-2 kb，反应时间可以采用5-10 min。

如果插入片段长度为2 kb-3 kb，反应时间可以采用10-20 min;更长片段可采用 30 min至过夜。

3. 转化

- 1) 制备含有氨苄青霉素终浓度100 μ g/ml的LB琼脂糖平板。将平板放置在37 $^{\circ}$ C，至少预热20 min。
- 2) 取部分连接产物加到50-100 μ l DH5 α 感受态细胞中（感受态细胞应刚从-70 $^{\circ}$ C冰箱取出放于冰浴上，待刚刚解冻时加入连接产物，连接产物的加入量不超过感受态细胞体积的十分之一），轻弹混匀，冰浴30 min（必要时请使用超螺旋质粒pUC19同步转化感受态细胞作为对照检测转化效率，将1 μ l 的Compcell Control Plasmid pUC19加入另一只感受态细胞管中作为对照，其余的操作步骤与连接产物的转化步骤同步进行）。
- 3) 将离心管置于42 $^{\circ}$ C水浴90 sec，取出管后立即置于冰浴中放置2-3 min，期间不要摇动离心管。
- 4) 向离心管中加入350 μ l 37 $^{\circ}$ C预热的SOC或LB（不含抗生素）培养基，180 rpm、37 $^{\circ}$ C振荡培养45-60 min。目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达，使菌体复苏。

5) 将离心管中的菌液混匀，吸取200 μl 加到含氨苄青霉素的LB固体琼脂培养基上，用无菌的弯头玻棒或玻璃珠轻轻的将细胞均匀涂开。待平板表面干燥后，倒置平板，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养12-16 h。

4. 检测

1) 常规检测：将得到的白色菌落接种1-5 ml LB（含有终浓度为50-100 $\mu\text{g/ml}$ 的氨苄青霉素）培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养过夜，保存菌种后提取质粒，应用PCR或酶切方法鉴定插入片段是否正确。快速检测：挑取白色菌落直接进行PCR检测（具体方法见分子克隆第三版）或使用本公司pGM-T重组菌落PCR鉴定试剂盒（VI102）进行快速菌液鉴定。

2) 测序鉴定：使用常规或快速方法进行初步的鉴定后进行序列的测定。

注意事项

1. 连接使用的PCR片段3'端应带有A末端，如果是使用pfu等高保真聚合酶扩增的不带A末端的平末端片段，可选用pLB零背景快速克隆试剂盒（VT205/206）或pGM-T平末端连接试剂盒（VT402）进行连接反应。
2. 转化过程中使用Control Insert DNA做对照是非常必要的，在实验出现问题时可以确定原因。
3. 建议留下部分连接产物，在出现问题后能迅速的补救，减少不必要的重复实验。
4. 涂布用量可根据具体实验作相应调整。如转化的DNA总量较多，可取更少量转化产物涂布平板；反之，如转化的DNA总量较少，可取200-300 μl 转化产物涂布平板。如果预计的克隆较少，可通过离心（4000 rpm，2 min）后吸除部分培养液，留下适量的培养基悬浮菌体后将其涂布于一个平板中（涂布剩余的菌液可置于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，如果次日的转化菌落数过少可以将剩下的菌液再涂布新的培养板）。

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品