

## Zero pFAST-TA Cloning Kit 零背景 pFAST-TA 克隆试剂盒

货号: DT121-01

规格: 20 次

保存: -20 °C

### 【产品简介】

本产品利用Topoisomerase 原理可以在瞬间完成连接的优良特性, 结合特有的工艺制成。与传统T4连接酶原理不同, 可以不用冰浴和热休克, 室温5min 内完成连接, 37°C 复苏10min即可涂板, 全过程只需15-20min; 无自连、零背景, 无需蓝白斑筛选, 长至10kb 的片段亦可高效连接, 阳性克隆率近100%。

提示: 测序只能采用 M13F/M13R 通用引物测序 (见后面图谱), 但是不能采用 M13(-47)/M13(-48)通用引物测序。菌落 PCR 可使用和测序相同的引物。

### 【产品组分】

试剂盒组成	20 次(DT121-01)	100 次(DT121-05)
pFAST-T Vector(30 ng/μl)	20 μl	100 μl
1 Kb Control (30 ng/μl)	5 μl	5 μl
10 × Enhancer	20 μl	100 μl

### 【保存条件】

-20°C恒温保存, 有效期一年。

### 【操作步骤】

#### 1. PCR 产物制备:

- (1) PCR引物不能磷酸化。
- (2) 使用Taq系列的DNA聚合酶扩增。
- (3) 仅有目的条带、无非特异条带和引物二聚体的PCR产物可直接进行连接反应, 无需纯化, 否则建议胶回收纯化。如果以质粒为模板的PCR产物则建议进行纯化。

#### 2. 连接反应:

(1) 室温 (25°C-35°C) 按照如下体系操作 (10μl 体系):

纯化后的 PCR 产物/或者 1μl 1kb control	0.5-5μl
pFAST-T Vector	1μl
10 × Enhancer	1μl
ddH <sub>2</sub> O	Up to 10 μl

所有组分加完后, 用移液器轻轻吹打混匀或者轻弹管底混匀, 低速瞬时离心后室温 (25°C-35°C) 连接反应 5 min。长片段或者连接困难片段可以延长连接时间到 10-15 分钟, 温度可选 37°C, 可显著增加转化子数量。

注: 此步骤在室温进行, 不可置于冰上, 否则会降低连接效率。

不同大小插入片段的推荐用量:

插入片段大小 (bp)	最佳用量 (ng)
100-1000	10-40
1000-2000	40-80
2000-5000	80-150

(2) 连接产物可直接转化感受态细胞或贮存于-20 °C。

如尚未准备好感受态细胞, 可以将连接产物短时间置于冰上备用。

### 3. 转化:

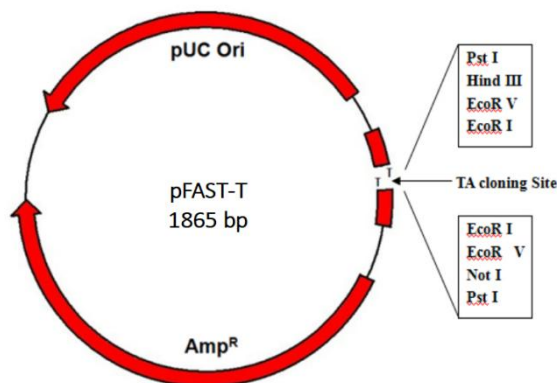
- (1) 50-100  $\mu$ l 感受态细胞, 置于室温解冻, 完全解冻后(约 1min 左右) 轻弹几次将细胞均匀悬浮。
- (2) 加入 5  $\mu$ l 连接液(最多可全部加入, 但体积不要超过感受态细胞体积的 1/10), 轻轻混匀, 冰上放置 5min。42 $^{\circ}$ C 水浴热休克 60 秒, 冰上放置 2-3 分钟。
- (3) 加 300-500  $\mu$ l 平衡至室温的 LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素), 37 $^{\circ}$ C 180 rpm 振荡培养 10min。若感受态细胞转化效率低或者插入片段大于 2 Kb, 可以增加复苏时间至 30-60min 以得到更多的转化子。
- (4) 取 100-200  $\mu$ l 菌液涂板(含氨苄青霉素 100  $\mu$ g/ml), 过夜培养。

### 4. 转化子的筛选鉴定:

本产品阳性率极高, 一般所见即所得, 在无杂菌污染及转化子数量不算太少的情况下, 所长菌落基本为包含插入片段的阳性克隆。因此插入片段不超过 2-3 Kb 时, 无需鉴定, 直接挑菌测序。

- (1) 酶切法鉴定: 用上述培养的白色菌落的菌液抽提质粒, 插入片段较大的情况下, 直接跑电泳看质粒大小就能鉴定出有插入的质粒, 还可用 EcoR I/EcoR V 单酶切释放插入片段或用其它合适的酶切, 琼脂糖凝胶电泳检查片段大小, 确定是否含有目的片段。
- (2) PCR 法鉴定: 挑取菌落直接进行 PCR 检测。
- (3) 测序法: 使用通用 M13F/M13R 引物测序来确定是否含有目的克隆。**注意测序引物不能采用 M13(-47)/M13(-48)通用引物测序。**

### ❖ pFAST-T 载体图谱:

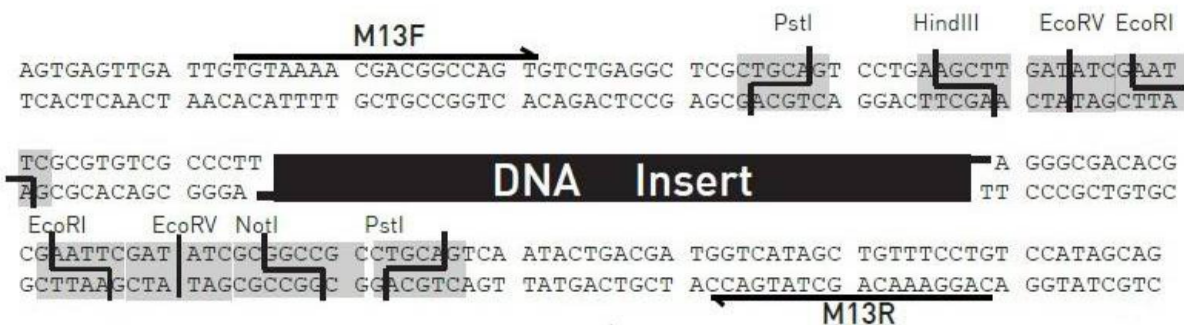


### ❖ pFAST-T 载体通用测序引物序列:

M13F: TGTA AACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

### ❖ pFAST-T 载体多克隆位点序列:



### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 承诺为您更换等量合格产品, 本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。