

**公司产品仅供科学研究使用、不得用于临床诊断！****商品属性：**

产品名称	规格	货号
pUC57 Simple TA/平端通用克隆载体	20T	A-PJ1085

**描述：** pUC57 Simple 通用克隆载体采用了 TOPO 酶连接技术，载体预先偶联上 TOPO 酶，当加入 PCR 扩增产物后，5 min 就可以完成连接反应，连接阳性率高。pUC57 Simple 通用克隆载体消除了大部分的常用酶切位点，便于后续亚克隆。该产品适用于 Taq 酶扩增的含“A”尾巴和高保真酶扩增的 PCR 产物的连接，载体含有氨苄青霉素抗性筛选标记。

**注意：** RTS DH5a 冻干感受态在未溶解状态下，可于-20℃长期保存 (>2 年)，已经溶解后，请-60℃以下保存 (3 个月)。

**主要特征**

(1) 快速连接，最快仅需 5min；(2) 操作简单，仅需加入载体和片段即可；(3) 无需蓝白斑筛选，阳性率高；(4) 不包含任何酶切位点，便于后续亚克隆(5) 平末端和 A 尾产物通用。

**注意：** 引物不能磷酸化。

**测序引物**

正向测序引物：M13F(-47): 5'- CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3'；

反向测序引物：M13R(-48): 5'- AGCGGATAACAATTCACACAGGA-3'；

**操作步骤****1. PCR 产物的纯化**

1.1 PCR 扩增完毕后，电泳检测产物，如无非特异性扩增、无引物二聚体、条带单一明亮，则可采用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后用于连接。产物不经纯化也可以进行连接，但效果稍差一些。

1.2 PCR 扩增完毕后，电泳检测产物，如有非特异性扩增条带或引物二聚体，则必须采用胶回收后用于连接。

1.3 PCR 扩增模板来源于 Amp 抗性质粒，则必须采用胶回收后用于连接。

**2. PCR 用量和连接时间**

PCR 产物大小 PCR 产物用量 载体用量 摩尔比 连接时间 阳性率

0.1~1kb 2~10ng 1 μl 1: 5~10 5~10min >95%

1~3kb 10~20ng 1 μl 1: 5~10 15~20min >90%

>3kb 5ng/kb 1 μl 1: 5~10 30min >85%

**3. 连接反应**

向 0.2 ml EP 管中依次加入如下试剂

**成分用量**

PCR 产物 0.5~4 μl (用量参考上表)

pUC57 Simple Vector 1 μl

加无菌水至总体积为 5 μl

轻轻吹打混合均匀后，室温 (25℃) 孵育 5~30min，通常放置 10min。

关于 PCR 产物的用量说明：在 PCR 产物回收后 (在无法进行 NanoDrop 测定浓度的情况下)，按照一般的经验可估算产物的用量，原则为：3 μl 回收产物在琼脂糖凝胶电泳后，可清晰判断的情况下，使用 0.5~1 μl 回收产物 (约 5~15 ng) 进行连接即可。回收产物难以观察的情况下使用 4 μl 回收产物 (约 5~10 ng) 进行连接。使用过量的 PCR 产物将会导致连接效率低下，长斑数量和阳性率急剧下降。