

## pUCm-T 载体

产品编号	产品名称	包装
D2006	pUCm-T载体	20次

### 产品简介：

- pUCm-T载体(pUCm-T Vector)是用于克隆含有A末端PCR产物的理想载体。可以通过蓝白斑筛选有插入片段的重组克隆。
- 很多DNA聚合酶在进行PCR扩增时会在PCR产物双链DNA每条链的3'端加上一个突出的碱基A。pUCm-T载体是一种已经线性化的载体，载体每条链的3'端带有一个突出的T。这样，pUCm-T载体的两端就可以和PCR产物的两端进行正确的AT配对，在连接酶的催化下，就可以把PCR产物连接到pUCm-T载体中，形成含有目的片段的重组载体。
- pUCm-T载体的主要信息如下：
 

Base pairs	2773
Lac Z promoter	142-171
M13/pUC Reverse Primer	204-221
Lac Z	222-534
Multiple cloning region	233-376
M13/pUC Sequencing Primer	378-395
Synthetic Beta-lactamase (Ampr) coding region	972-1832
ColE1 origin of replication(rep)	1987-2606
- pUCm-T载体的图谱如图1：

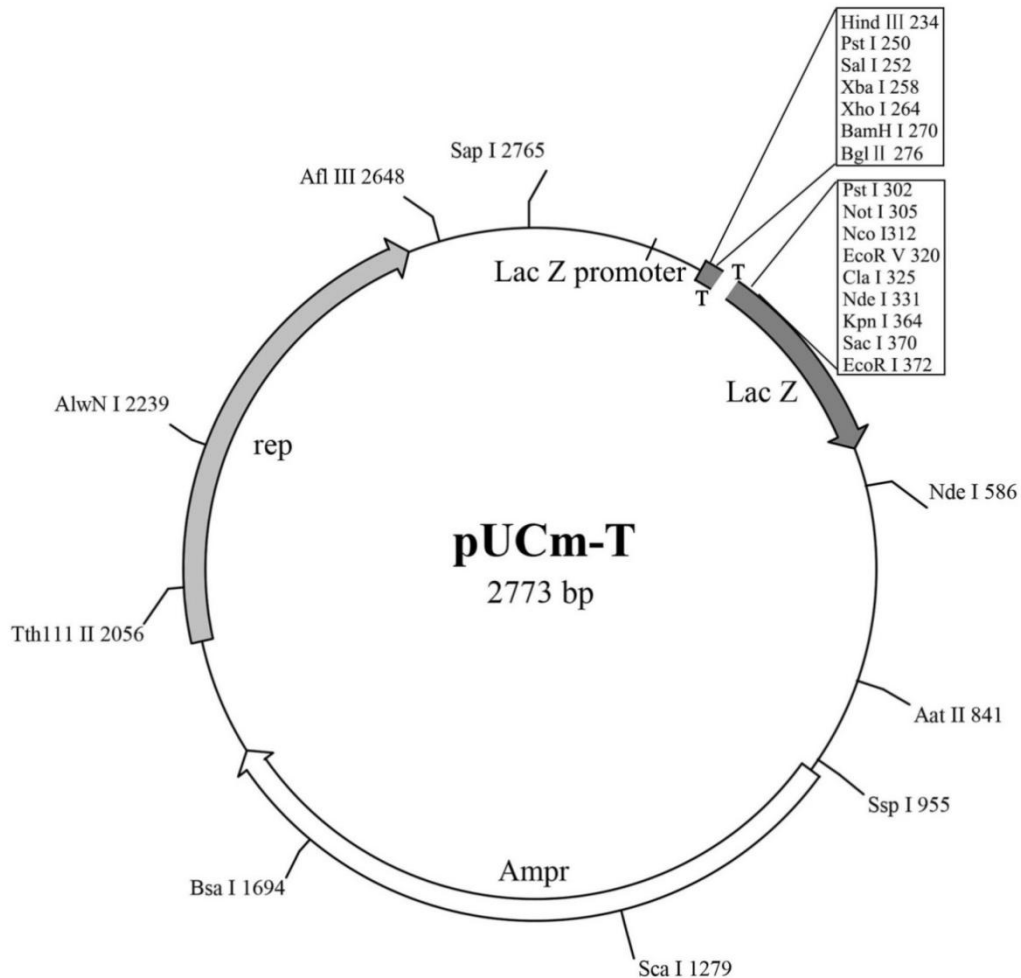


图1. pUCm-T载体图谱示意图

➤ pUCm-T载体的多克隆位点的详细序列如下(请特别注意其中的Pst I不是单酶切位点):

```

                Lac Z
201 ACACAGGAAA   CAGCTATGAC   CATGAT→TACG   CCAAGCTTGC   ATGCCTGCAG
    TGTGTCCTTT   GTCGATACTG   GTACTAATGC   GGTTCGAACG   TACGGACGTC
        Xba I     Xho I BamH I Bgl II
251 GTCGACTCTA   GACTCGAGGG   ATCCAGATCT   CCAGTCTT GA   CCTGGTCTGC
    CAGCTGAGAT   CTGAGCTCCC   TAGGTCTAGA   GGTCAGA TCT   GGACCAGACG
    Pst I Not I   Nco I EcoR V Cla I Nde I       T7 promoter
301 AGGCGGCCCG   CCATGGGATA   TCATCGATCA   TATGTCGCC   TATAGTGAGT
    TCCGCCGGCG   GGTACCCTAT   AGTAGCTAGT   ATACAGCGGG   ATATCACTCA
        Kpn I     Sac I EcoR I
351 CGTATTACGG   TACCAGACTC   GAATTCACTG   GCCGTCGTTT   TACAACGTCG
    GCATAATGCC   ATGGCTCGAG   CTTAAGTGAC   CGGCAGCAAA   ATGTTGCAGC
  
```

➤ pUCm-T载体中没有的酶切位点(Restriction enzymes that do not cut pUCm-T)包括:

```

Afl II   Age I   Apa I   Asc I   Avr II   Bbs I   Bbv II   Bcl I   Blp I
BsaA I   BseR I   Bsg I   BsiC I   BsiW I   BsmI   BsmF I   Bsp120 I   BspM II
BsrG I   BssH II   Bst1107 I   BstB I   BstE II   BstX I   Bsu36 I   Dra III
Eco47 III   Eco72 I   Esp I   Fse I   Hpa I   MluI   Msc I   Mun I   Nae I
NgoM I   Nhe I   Nru I   Nsi I   PflM I
Pme I   Pml I   PpuM I   PspA I   Rsr II   Sac II   Sfi I   Sma I   SnaB I
Spe I   Spl I   Srf I   Stu I   Xca I   Xma I
  
```

➤ pUCm-T载体中的单酶切位点(Restriction enzymes that cut pUCm-T once)包括:

HinD III	A`AGCT,T	234	Acc65 I	G`GTAC,C	360
BspM I	ACCTGC 10/14	239	Asp718	G`GTAC,C	360
Sph I	G,CATG`C	244	Kpn I	G,GTAC`C	364
Sal I	G`TCGA,C	252	Ban II	G,RCY`C	370
Acc I	GT`MK,AC	253	Sac I	G,AGCT`C	370
HinC II	GTY RAC	254	Apo I	R`AATT,Y	372
Hind II	GTY RAC	254	EcoR I	G`AATT,C	372
Xba I	T`CTAG,A	258	Kas I	G`GCGC,C	533
Ava I	C`YCGR,G	264	Nar I	GG`CG,CC	534
PaeR7 I	C`TCGA,G	264	Ehe I	GGC GCC	535
Xho I	C`TCGA,G	264	Bbe I	G,GCGC`C	537
BamH I	G`GATC,C	270	EcoO109 I	RG`GNC,CY	780
BsaB I	GATNN NNATC	275	Aat II	G,ACGT`C	841
Bgl II	A`GATC,T	276	Ssp I	AAT ATT	955
Xcm I	CCANNNN,N`NNNNTGG	289	Xmn I	GAANN NNTTC	1160
Tth111 I	GACN`N,NGTC	293	Bsp1286 I	G,DGCH`C	1177
Not I	GC`GGCC,GC	305	Sca I	AGT ACT	1279
Eag I	C`GGCC,G	305	EcoN I	CCTNN`N,MNAGG	1399
Xma III	C`GGCC,G	305	Cfr10 I	R`CCGG,Y	1675
Dsa I	C`CRYG,G	312	Bsa I	GGTCTC 7/11	1694
Nco I	C`CATG,G	312	Ahd I	GACNN,N`NNGTC	1760
Sty I	C`CWWG,G	312	AlwN I	CAG,NNN`CTG	2239
EcoR V	GAT ATC	320	Afl III	A`CRYG,T	2648
Cla I	AT`CG,AT	325	Sap I	GCTCTTC 8/11	2765

➤ pUCm-T载体的全序列信息请参考碧云天的网站上该质粒的信息。

➤ pUCm-T载体是在pUC19载体的基础上改造而成，除多克隆位点外，其余序列同pUC19(GenBank Accession Number M77789)。

➤ 少量自连的载体转化得到的克隆由于编码了LacZ基因，而在IPTG/X-Gal平板上呈现蓝色。大部分重组的载体，由于插入片段破坏了LacZ基因，因而在IPTG/X-Gal平板上转化得到白色克隆。这样就可以通过蓝白斑非常容易地筛选出重组克隆，蓝白斑筛选结果示意图如图2。



图2. pUCm-T载体的蓝白斑筛选结果示意图。pUCm-T载体和PCR产物片段进行连接，转化后在IPTG/X-Gal平板的上长出的克隆，其中白色克隆代表PCR产物片段可能插入到pUCm-T载体中，但后续还需要酶切、PCR或者测序确认。

- 对于重组的质粒可以使用载体多克隆位点上的两个PstI酶切位点进行PstI单酶切鉴定，也可以使用廉价且高效的EcoRI、BamHI、XbaI、HindIII等内切酶进行双酶切鉴定。
- 构建完成的质粒可以通过质粒上的正反两个M13引物位点进行测序或通过T7 promoter上的T7引物位点进行测序。
- 构建完成的质粒可以利用T7 RNA polymerase promoter进行体外转录，用于探针标记等。
- 一个包装的本载体共可以进行20次连接反应。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D2006	pUCm-T载体	20 $\mu$ l
—	说明书	1份

#### 保存条件：

-20 $^{\circ}$ C保存。

#### 注意事项：

- 本质粒未经碧云天书面许可不得用于任何商业用途，也不得移交给订货人所在实验室外的任何个人或单位。
- DNA聚合酶是否可以在PCR产物3'端加A需参考该DNA聚合酶的说明。对于PCR产物为平端的情况，不适合用于T载体的连接反应。对于平端的PCR产物可以先进行在3'端加A的反应，再用T载体进行克隆。
- 进行PCR产物克隆时需自备连接、转化等相关试剂、试剂盒。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明：

##### 1. PCR产物纯化

- a. PCR产物可以通过PCR纯化试剂盒或凝胶回收试剂盒(例如碧云天生产的D0033 PCR纯化试剂盒或D0056 DNA凝胶回收试剂盒)进行PCR产物纯化。对于PCR产物条带不是非常单一的情况，宜采用电泳后DNA凝胶回收的纯化方法，这样可以去除PCR扩增出来的非特异性条带的干扰。

##### 2. 连接反应

- a. 对于常规的DNA ligase连接反应，请参考下面的连接反应体系，或按DNA ligase的说明书进行操作。每个连接反应使用1微升pUCm-T载体，约0.2pmol PCR产物，在20微升连接体系中16 $^{\circ}$ C连接过夜。

Sterilized Water	? $\mu$ l
T4 DNA Ligase Buffer (10X)	2 $\mu$ l
Purified PCR Product	?? $\mu$ l
pUCm-T Vector	1 $\mu$ l
T4 DNA Ligase (5-10U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
总体积	20 $\mu$ l

- b. 对于快速连接试剂盒，请参考相应说明书进行连接反应。pUCm-T载体的用量还是为1微升，PCR产物的推荐用量约为0.2pmol。实际做连接反应时对PCR产物的使用量没有必要严格定量，根据PCR产物的亮度大致加入适量的PCR产物进行连接反应即可获得比较理想的连接效果。连接反应中使用的水尽量使用Milli-Q级纯水，或使用双蒸水或三蒸水。

##### 3. 转化和筛选阳性克隆

按照常规方法进行转化和蓝白斑筛选。转化可以采用碧云天生产的D0302 超级感受态细菌制备试剂盒。蓝白斑筛选所需的IPTG (ST098)和X-Gal (ST912)可以向碧云天购买。对于白斑可以进行酶切鉴定，通常酶切鉴定正确后可以测序鉴定。

#### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D2006	pUCm-T载体	20次

D0033	PCR/DNA纯化试剂盒	50次
D0056	DNA凝胶回收试剂盒	50次
D0302	超级感受态细菌制备试剂盒	100次
ST097	IPTG	1g
ST098	IPTG	5g
ST912	X-Gal	100mg

### 使用本产品的文献：

1. Wei Zhou, Min-Min Chen, Hui-Ling Liu, Zi-Lin Si, Wen-Hui Wu, Hong Jiang, Lin-Xiao Wang, Nosratola D Vaziri, Xiao-Fei An, Ke Su, Cheng Chen, Ning-Hua Tan, Zhi-Hao Zhang. Dihydroartemisinin suppresses renal fibrosis in mice by inhibiting DNA-methyltransferase 1 and increasing Klotho. *Acta Pharmacol Sin.* 2022 Oct;43(10):2609-2623. doi: 10.1038/s41401-022-00898-3.
2. Hu J, Chai Y, Wang Y, Kheir MM, Li H, Yuan Z, Wan H, Xing D, Lei F, Du L. PI3K p55 $\gamma$  promoter activity enhancement is involved in the anti-apoptotic effect of berberine against cerebral ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 2012 Jan 15;674(2-3):132-42.
3. Zhou H, Chen S, Wang W, Wang Z, Wu X, Zhang Z. Nanog inhibits lipopolysaccharide-induced expression of pro-inflammatory cytokines by blocking NF- $\kappa$ B transcriptional activity in rat primary microglial cells. *Mol Med Rep.* 2012 Mar;5(3):842-6.
4. X. Guo, S. Li, B. Du, Z. Li, W. Yang, W. Dong, J. Liu, Z. Zheng. Neurogenin3 regulates sohlh during spermatogenesis in mice. *The Journal of Animal & Plant Sciences.* 2015;25(5):1303-10.
5. Dai L, Liu C, Yu L, Song C, Peng L, Li X, Tao L, Li G. Organic Matter Regulates Ammonia-Oxidizing Bacterial and Archaeal Communities in the Surface Sediments of Ctenopharyngodon idellus Aquaculture Ponds. *Front Microbiol.* 2018 Sep 24;9:2290
6. Yang Deng, Peng Li, Wenbin Liu, Rui Pu, Fan Yang, Jiahui Song, Jianhua Yin, Xue Han, Chengzhong Li, Jun Zhao, Hongyang Wang, Guangwen Cao. The genetic polymorphism down-regulating HLA-DRB1 enhancer activity facilitates HBV persistence, evolution and hepatocarcinogenesis in the Chinese Han population *J Viral Hepat.* 2020 Nov;27(11):1150-1161.;doi: 10.1111/jvh.13353.

Version 2024.03.12