

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:

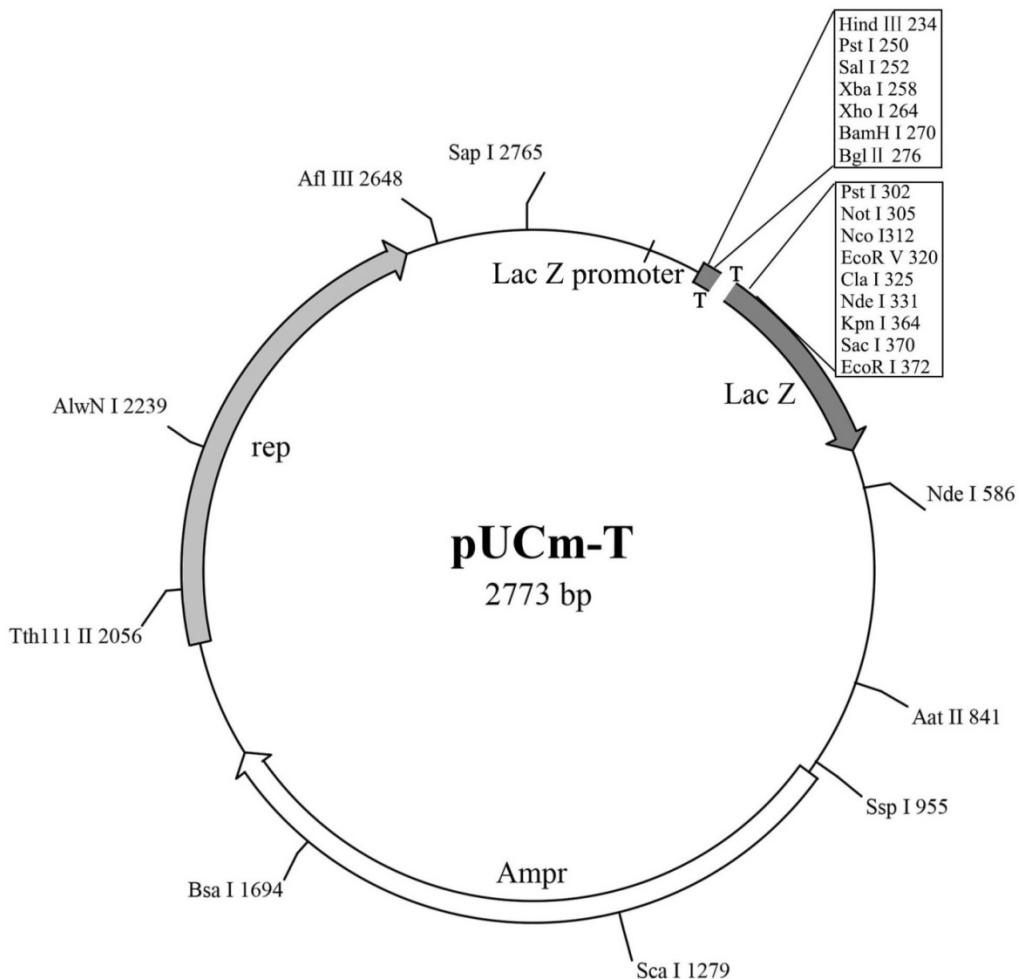


图1. pUCm-T载体图谱示意图

➤ 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 CATGATTACG CCAAGCTTGC ATGCCTGCAG
    TGTGTCCTTT   GTCGATACTG GACTAATATGC GGTTCGAACG TACGGACGTC
        Xba I     Xho I BamH I Bgl II
251 GTCGACTCTA   GACTCGAGGG ATCCAGATCT CCAGTCT GA CCTGGTCTGC
    CAGCTGAGAT   CTGAGCTCCC TAGGTCTAGA GGTTCAGA TCT GGACCAGACG
    Pst I Not I   Nco I EcoR V Cla I Nde I       T7 promoter
301 AGGCGGCCGC   CCATGGGATA TCATCGATCA TATGTCGCC TATAGTGAGT
    TCCGCCGGCG   GGTACCCTAT AGTAGCTAGT ATACAGCGGG ATATCACTCA
        Kpn I     Sac I EcoR I
351 CGTATTACGG   TACCCGAGCTC GAATTCACCTG 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 | Bsm I | 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 | Mlu I |
| 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, RGCY`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, NNAGG | 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 | GCTCTC 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 | 20μl |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件：

-20°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°C连接过夜。

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

- 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. Hu J, Chai Y, Wang Y, Kheir MM, Li H, Yuan Z, Wan H, Xing D, Lei F, Du L. PI3K p55 γ 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.
2. Zhou H, Chen S, Wang W, Wang Z, Wu X, Zhang Z. Nanog inhibits lipopolysaccharide-induced expression of pro-inflammatory cytokines by blocking NF- κ B transcriptional activity in rat primary microglial cells. *Mol Med Rep.* 2012 Mar;5(3):842-6.
3. 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.
4. 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
5. 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 2019.02.19