



pGADT7 Cloning Kit pGADT7克隆构建试剂盒

目录号

DLV303

产品简介

本产品是以pGADT7载体为基础框架开发的克隆构建试剂盒。包含经标准化工艺制备的高质量线性化载体,提供已优化验证的同源序列,使用该产品无需进行载体线性化、载体纯化、同源臂设计与片段酶切,仅需一步即可将目的片段定向无缝克隆至pGADT7载体上,大幅简化了实验操作,提高了实验成功率。

产品组成

组分	规格
pGADT7 Linear-Vector ^a (10 ng/μL)	20 μL
2× Cloning Mix	100 μL
Control Template ^b	10 μL

a.pGADT7线性化载体, Amp抗性, 线性化方式为EcoRI与XhoI酶切, 大小为7953 bp;

b.阳性对照片段, 大小1 kb, 用于检测连接效率。

产品应用

本产品适用于pGADT7载体为基础的酵母杂交实验。

产品特点

- 高效:载体构建成功率高达90%以上;
- 便捷:无需载体线性化等复杂操作,一步完成克隆构建;
- 快速:重组反应仅需5~15 min。

使用方法

1.片段准备

1)按照以下表格合成含接头的扩增引物:

扩增引物准备 (5'→3')	
F:	ATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTC+目的片段特异性F引物
R:	ATCTACGATTCATCTGCAGCTCGAG+目的片段特异性R引物

注:扩增引物由两部分组成:固定序列+特异性引物。红色标记部分为酶切识别位点。

2)使用上述引物进行目的片段PCR扩增;扩增产物需进行凝胶纯化(推荐使用达领DNA凝胶回收试剂盒(安全便捷型),目录号:DLN801)并电泳检测其质量和浓度;

注:若目的片段以质粒为模板扩增获得,为防止产生空载体背景,建议用DpnI消化去除质粒模板。消化完成后,80℃失活后再用于重组实验。

2.重组反应

1)取出试剂盒各组分子冰上解冻,待解冻完全后低速瞬时离心;

2)按照下表配制反应体系;

组分	用量
pGADT7 Linear-Vector	1 μL
2× Cloning Mix	5 μL
目的片段 ^a	见标注
ddH ₂ O	Up to 10 μL

a.目的片段投入量参考下表(载体与片段摩尔比约为1:2~1:5),使用阳性对照片段投入量为1 μL。

片段大小	投入量
<1000 bp	见标注
1000~2000 bp	5~6 ng
2000~3000 bp	8~12 ng
>3000 bp	见标注

注:根据载体与片段的摩尔比例为1:2~1:5,按照公式:目的片段用量 (ng) = 1.26 × 摩尔比例倍数 × 目的片段长度 (kb) 计算目的片段投入量(例:载体与片段的摩尔比例为1:3,目的片段长度为0.5 kb,目的片段用量 = 1.26 × 3 × 0.5 = 1.89 ng)。

3)体系配制完成后,用移液枪轻轻吹打混匀,短暂瞬时离心将反应液收集至管底,50℃反应5~15 min。

注:若进行较长片段或复杂片段连接,可增加反应时间至45 min,反应建议在水浴锅或PCR仪上进行。

3.转化与鉴定

转化:按照相关感受态产品说明书操作;

鉴定:推荐使用pGADT7-T7-F (TAATACGACTCACTATAGGG)及pGADT7-ADH1ter-R (CATAAATCATAAGAAATTCGC)进行菌落鉴定与测序。

注意事项

• 当长菌数较少或克隆阳性率偏低时, 主要可能原因是片段质量不佳导致的连接效率降低, 推荐重新制备高质量片段, 并电泳检测浓度与质量。

应用实例

使用pGADT7载体进行阳性与阴性对照实验, 克隆效果如下图所示: 阳性对照长斑数多, 阴性对照长斑数非常少。由本实验可知, 当片段质量较好时, 本产品连接效率非常高(平板a); 当不加入片段(或片段质量不佳)时, 本产品会增加空载转化率, 导致克隆成功率降低(平板c)。

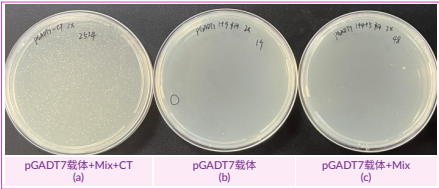
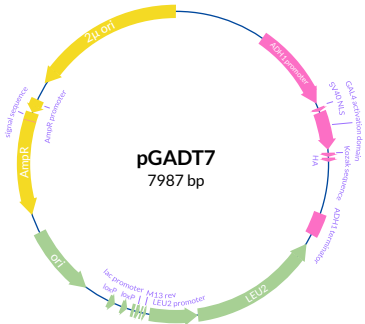


图1.pGADT7载体阳性与阴性对照实验效果

载体图谱



保存条件

-25~-15°C保存, 保质期1年。≤0°C运输。

技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议, 欢迎随时与我们联系:
product@tsingke.com.cn。

关联产品推荐

产品名称	货号	应用
FlashPure快速质粒小提试剂盒	DLN702	适用于1-5 mL菌液质粒DNA快速提取
T8高保真PCR预混液	DLP201	适用于基因组、cDNA、噬菌体、质粒等样品的扩增
DNA凝胶回收试剂盒 (安全便捷型)	DLN801	适用于PCR产物直接回收、DNA片段的凝胶回收、酶切产物的凝胶回收等
T5菌P专家	DLP102	适用于克隆鉴定、以微生物为模板的直接扩增实验
DL-Y2HGold感受态细胞	DLC402	适用于酵母双杂实验, 检测转化率>10 ⁴ cfu/μg
Trelief® 5a感受态细胞	DLC101	适用于常规克隆、蓝白斑筛选等实验

