



pcDNA3.1 Cloning Kit pcDNA3.1克隆构建试剂盒

目录号

DLV302

产品简介

本产品是以pcDNA3.1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,使用该产物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pcDNA3.1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
pcDNA3.1 Linear-Vector ^a (10 ng/μL)	20 μL
2× Cloning Mix	100 μL
Control Template ^b	10 μL

a. pcDNA3.1线性化载体, Amp抗性, 线性化方式为EcoRI与XbaI酶切, 大小5431 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pcDNA3.1载体为基础的真核表达实验。

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:

pcDNA3.1扩增引物准备 (5'→3')	
F:	AGTCCAGTGTGGTGAATTC+目的片段特异性F引物
R:	GTTTAAACGGGCCCTCTAGA+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°C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
pcDNA3.1 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	8~9 ng
2000~3000 bp	12~18 ng
3000~5000 bp	19~28 ng
5000~10000 bp	38~46 ng
≥10000 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) = 1.84 × 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 = 1.84 × 3 × 0.5 = 2.76 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°C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pcDNA3.1-F (CGTGGATAGCGGTTTGACTC) 及pcDNA3.1-R (ATGACACCTACTCAGACAATGC) 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pcDNA3.1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)。

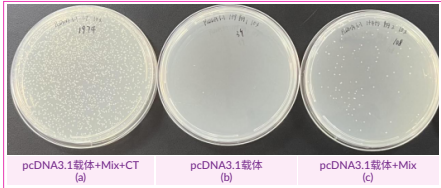
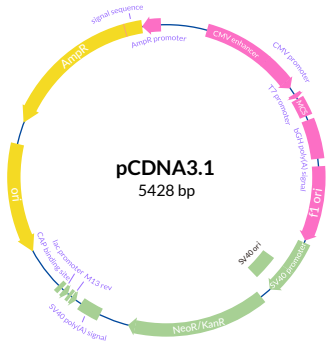


图1.pcDNA3.1载体阳性与阴性对照实验效果

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
Trelief® 5α感受态细胞	DLC101	适用于常规克隆、蓝白斑筛选等实验
TSnanfect V2转染试剂	TSV405	高效细胞转染试剂,不受抗生素和血清影响,转染后无需更换培养液

