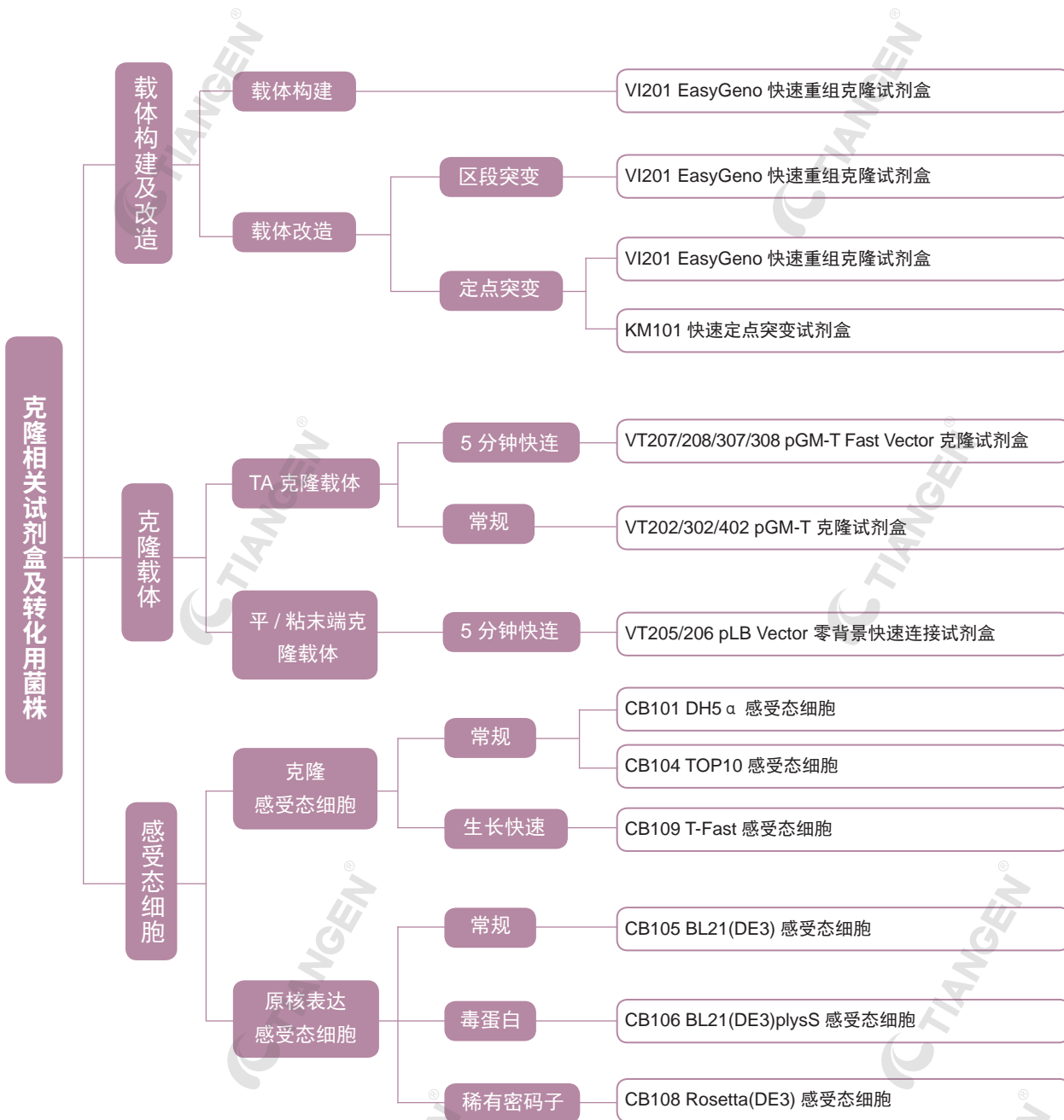


克隆系统相关产品选择指南

在分子生物学实验中，经常要克隆 DNA 分子，用于测序、构建探针、在不同宿主中表达重组蛋白等，目的 DNA 片段可由 PCR、酶切或反转录得来。为确保您能得到最佳实验结果，TIANGEN 公司为您提供了十几种不同的产品满足您的不同需要，从而高效地进行下一步实验。



载体构建技术及试剂盒简介

载体构建是分子生物学研究中最常用的实验技术，是分子生物学研究常用的手段之一。目前常用载体构建技术主要包括基于限制性内切酶/DNA 连接酶的酶切连接技术，基于 DNA 拓扑异构酶的 TOPO 技术，以及基于 DNA 序列同源性的重组技术等。

■ 酶切 / 连接技术——自制的老式克隆技术

基于 II 型限制性内切酶能够切割 DNA 片段产生粘性末端或平末端的原理，将不同来源的 DNA 分子使用同一限制性内切酶进行酶切，形成相同的末端序列（通常为粘性末端）。粘末端互补配对后，再利用 T4 DNA 连接酶催化两条相邻双链 DNA 分子的 3' -OH 和 5' -P 产生磷酸二酯键，从而将特定的两条 DNA 序列连接在一起。

优点：能够进行片段的定向克隆、应用广泛。

缺点：受酶切位点限制；需多步酶切 / 纯化，操作复杂，耗时长；效率较低，长片段连接较难；一次只能将单一片段构建进入载体。

■ TOPO 技术——载体受限的不定向快速克隆技术

基于拓扑异构酶的磷酸二酯键能够被双链 DNA 的 5' -OH 所攻击，形成新的磷酸二酯键的原理，将两条不同来源的 DNA 分子连接起来，从而完成载体构建。

优点：连接反应快速、操作简便。

缺点：只适用于特定载体；插入不能定向（定向插入需特殊引物设计，定向载体价格昂贵）；只能将单一片段构建进入载体；需控制反应时间，超时连接易损伤载体。

■ EasyGeno 重组技术——不受载体限制的快速定向克隆技术

EasyGeno 快速重组克隆试剂盒中所包含的混合酶可将载体和片段的同源区域在双链的 3' 端进行重组连接，最终得到无缺口闭环质粒，可直接转化感受态细胞，筛选克隆。EasyGeno 重组技术可实现单插入片段的定向重组进入载体、多片段同时定向构建进入载体、规模化的高通量载体构建、载体改造中的点突变及区段突变等。

EasyGeno 重组技术特点：

- 不受酶切位点限制，不受载体限制
- 一步反应，15 分钟实现载体和片段的重组
- 可同时实现 1-5 个片段的定向插入
- 可实现规模化载体构建
- 效率是传统酶切 / 连接方法的 5-10 倍

克隆载体技术及试剂盒简介

■ TA 克隆使 PCR 产物克隆变得方便简单

克隆载体一般是能够在大肠杆菌中进行大量复制的质粒，用于目的 DNA 序列的扩增和保存。商业化的克隆载体为一段线性化的质粒，利用 T4 DNA 连接酶将目的片段与线性化质粒进行连接整合，根据线性质粒末端的不同，一般分为 TA 克隆载体和平末端克隆载体。克隆载体的选择主要依据扩增目的 DNA 序列时 PCR 产物的末端来决定。

■ 克隆载体的选择

DNA 聚合酶类型	PCR 产物类型	使用的克隆载体	推荐产品
Taq, Hotmaster Taq	PCR 产物 DNA 双链为 3' 带有突出的 A	TA 克隆载体	pGM-T Fast 快速克隆试剂盒； pLB 零背景快速克隆试剂盒； pGM-T 克隆试剂盒
Pfu, UltraHiFi	PCR 产物 DNA 双链为平末端	平末端克隆载体	pLB 零背景快速克隆试剂盒
Taq Plus, Long Taq, Taq Platinum	PCR 产物 DNA 为双链 3' 端带有突出的 A 和平末端的混合物	平末端克隆载体或 TA 克隆载体	pLB 零背景快速克隆试剂盒； pGM-T Fast 快速克隆试剂盒； pGM-T 克隆试剂盒

■ TIANGEN pGM-T Fast 系列快速克隆试剂盒

试剂盒中提供了高效 TA 克隆的 pGM-T Fast 系列载体以及 RapiLigation Mix，可实现片段 5 分钟快速克隆进入载体。pGM-T Fast Vector 经最新工艺制备，最大限度的避免了载体的自连，克隆阳性率近 100%。载体上有双 EcoRI 和双 NotI 酶切位点，并且具有氨苄抗性，可通过蓝白斑进行阳性克隆的筛选鉴定。

产品特点

- 高效快速：5 min 快速连接，阳性率近 100%。
- 灵敏广泛：适合浓度低至 0.025 pmol 片段和长至 8 kb 片段的高效连接。
- 操作便捷：配合使用新型 RapiLigation Mix，只需加入载体和片段即可进行连接反应。

■ TIANGEN pLB 零背景快速克隆试剂盒

pLB 零背景快速克隆试剂盒是一种阳性选择克隆系统，可以高效克隆各种 PCR 产物和任何具有平末端或粘性末端的 DNA 片段。试剂盒提供一个新颖的即用型阳性选择克隆载体 pLB Vector。该载体含有致死基因（内含多克隆位点），多克隆位点插入外源片段会引起基因失活，而自身环化的 pLB Vector（无外源片段插入）表达致死的毒性蛋白，转化后杀死大肠杆菌细胞。这种阳性筛选策略无需蓝白斑筛选，极大地加速了克隆筛选进程。

产品特点：

- 高效快速：零背景无需蓝白斑筛选，5 min 快速连接。
- 灵敏广泛：适合低浓度片段和长片段连接，适合平 / 粘末端连接。

转化与筛选技术简介

转化 (Transformation) 是将外源 DNA 分子引入受体细胞, 使之获得新的遗传性状的一种手段, 它是微生物遗传、分子遗传、基因工程等研究领域的基本实验技术。目前常用的转化方法为电转化法和化学转化法, 电转化法简便易行, 转化效率高, 但需要专门的电转化仪; 化学转化不需要额外的设备, 成本较低。

受体细胞经过一些特殊方法的处理后, 细胞膜的通透性发生了暂时性的改变, 能允许外源 DNA 分子进入体内并稳定地遗传给后代。这种受体细胞就叫做感受态细胞 (Competent Cells)。通常实验室自制的化学转化感受态细胞转化效率较低, 方法烦琐。TIANGEN 公司采用特殊工艺制备化学转化感受态细胞, 转化效率可达到 10^8 cfu/ μ g DNA 左右。

化学转化操作简要步骤

- 取感受态细胞置于冰浴上融化。
- 加入目的 DNA, 轻轻旋转以混匀内容物, 在冰浴中放置 30 min。
- 从冰浴中取出离心管, 立即置于 42°C 水浴中热激 60-90 sec。
- 取出离心管快速放置到冰浴中, 使细胞冷却 2-3 min。
- 每管加 500 μ l 无抗生素 SOC 或 LB 培养基, 置于 37°C 摇床振荡培养, 温育 45 min 使细菌复苏, 以便表达质粒编码的抗生素抗性标记基因。
- 取 100 μ l 已转化的感受态细胞转移到含相应抗生素的 SOB 或 LB 琼脂培养基上, 用一无菌的弯头玻棒轻轻的将细胞均匀涂开。
- 将平板置于室温直至液体被吸收。
- 倒置平板, 于 37°C 培养 12-16 h。

化学转化操作注意事项

- 感受态细胞最好保存在 -70°C 条件下, 不能反复冻融。
- 进行转化操作时, 应尽量在低温下进行。
- 转化时, DNA 溶液体积不要超过感受态细胞体积的 1/10。
- LB/SOC 培养基皆可用于转化, 但 SOC 培养基由于营养成分高, 故转化效果更佳。
- 整个操作过程均应在无菌条件下进行, 所有的试剂都要灭菌, 且注意防止被其它 DNA 污染。

如何筛选合适的宿主菌株

- 所选的宿主菌株应对所用质粒的抗生素抗性基因敏感。
- 如进行蓝/白斑筛选, 宿主菌 β -半乳糖苷酶的 α -肽编码区应在染色体或附加体上缺失掉 (*lacZ* Δ M15), DH5 α 和 TOP10 都能用于蓝/白斑筛选。
- 表达重组蛋白, 可使用带有可诱导的 T7 RNA 聚合酶基因的菌株, 如 BL21 (DE3)。
- 克隆大片段时 (> 8 kb), 为提高获得目的克隆的机会, 尽可能应用高转化效率的感受态细胞 (> 10^8 cfu/ μ g DNA)。

如何检测感受态细胞的效率

为确定感受态细胞的转化效率，可将一定量的超螺旋质粒转化到感受态细胞中，取一部分转化的细菌，涂布到选择培养基上，可用菌落生长单位 / μg DNA，按下面的方法计算感受态细胞的转化效率。

■ 计算公式：转化效率 = 产生菌落的总数 / 铺板 DNA 的总量

例如，取 1 μl (0.1 ng/ μl) 超螺旋质粒转化 100 μl 的感受态细胞。向转化反应液中加入 900 μl 培养液，让细菌复苏一小段时间，取 100 μl 铺板。培养过夜，产生 1000 个菌落。

转化 0.1 ng DNA，用 SOC 稀释到 1000 μl 后，取 1/10 涂平板，则涂平板共用 0.01 ng DNA 质粒，转化率 = 1000 克隆 / 0.01 ng DNA = 10^5 cfu/ng = 10^8 cfu/ μg 。

■ 转化效率 1×10^6 cfu/ μg DNA 可满足普通的亚克隆实验； 1×10^7 cfu/ μg DNA 用于进行更复杂的亚克隆、有限量的 DNA 的转化、TA 克隆实验；构建文库和突变要求用的感受态转化效率为 $>1 \times 10^8$ cfu/ μg 。

如何筛选重组菌落

■ 蓝 / 白斑筛选法

在涂布有 IPTG 和 X-Gal 的筛选平板上，重组菌株为白色，未转入重组质粒的菌株为蓝色。

X-Gal: X-Gal 为 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷，用二甲基甲酰胺溶解 X-Gal 配成 20 mg/ml 的贮存液。保存于玻璃管或聚丙烯管中，装有 X-Gal 的试管用铝箔封装以防因受光照而分解，并储存于 -20°C 。TIANGEN 公司的 X-Gal (RT119) 溶液已过滤除菌。

IPTG: IPTG 为异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (分子量为 238.3)，在 8 ml 蒸馏水中溶解 2 g IPTG 后，用蒸馏水定容至 10 ml，用 0.22 μm 滤器过滤除菌，分装成 1 ml 小份贮存于 -20°C 。TIANGEN 公司的 IPTG (RT108) 溶液已过滤除菌。

■ 酶切鉴定法

采用 TIANGEN 公司的 DP103 进行质粒小量提取后做限制性酶切实验。

■ 菌落 PCR 鉴定法

采用 TIANGEN 公司生产的一管便捷式 PCR 反应系统 (MasterMix 系列产品)，用灭菌的吸头挑取单个菌落到已加入 MasterMix 的 PCR 管中，再加入特异引物，进行 PCR 扩增。扩增反应前 94°C 变性 5 分钟，有利于细菌的裂解，提高 PCR 扩增效率。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

■ 菌落杂交法

菌落生长后转移到固体支持物如硝酸纤维素膜上，做原位裂解，使质粒附着到膜上，然后用插入片段特异核酸探针做菌落杂交。此法多用于筛选稀有克隆菌落。

EasyGeno 快速重组克隆试剂盒

EasyGeno Assembly Cloning kit

—新型载体构建技术，让载体构建更加快速、简便

目录号	包装	价格
VI201-01	10 rxn	900 元
VI201-02	20 rxn	1480 元

产品包装

试剂盒组成	10 次	20 次
2× EasyGeno 组装混合液	50 μ l	2×50 μ l
pUC19 线性化对照载体 (50 ng/ μ l)	10 μ l	10 μ l
2 kb 平末端对片段 (50 ng/ μ l)	10 μ l	10 μ l
ddH ₂ O	1 ml	2×1 ml

产品特点

- 载体构建不受酶切位点限制
- 15 分钟实现片段和载体的重组
- 效率是传统双酶切连接的 5-10 倍
- 可实现 100 bp-15 kb 片段构建进入载体
- 可实现 1-5 个片段同时定向构建进入载体

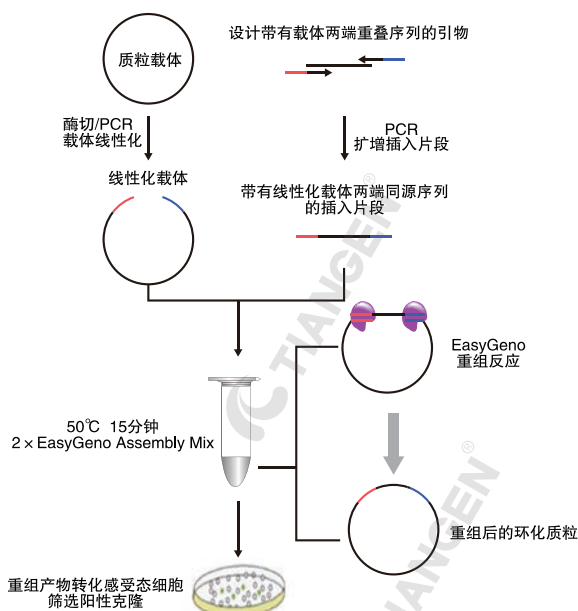
保存条件

-20°C

产品简介

EasyGeno 重组试剂盒基于 DNA 序列同源性进行片段重组，可快速将单个或多个片段定向克隆到任意载体中。精心设计的一管式预混试剂 2× EasyGeno Assembly Mix 可将线性化的载体和插入 DNA 片段在同源区域进行重组连接，得到无缺口的闭环质粒，继而直接转化感受态细胞并筛选克隆。该方案摆脱了酶切位点的限制，仅需通过 PCR 在插入 DNA 的两端加入线性化载体 15 bp 的一致性序列，即可实现目的片段定向重组进入载体。重组反应可在恒温条件下快速进行 (50°C 处理 15 min)，并能保证所得阳性率在 95% 以上。本试剂盒还能够实现多目的片段同时定向重组进入载体以及高通量的载体构建。

使用 EasyGeno 试剂盒进行载体构建流程



应用方向

长片段克隆更轻松



一步实现多片段克隆



轻松实现高通量载体构建



一步实现多点突变



一步实现区段突变



实验例

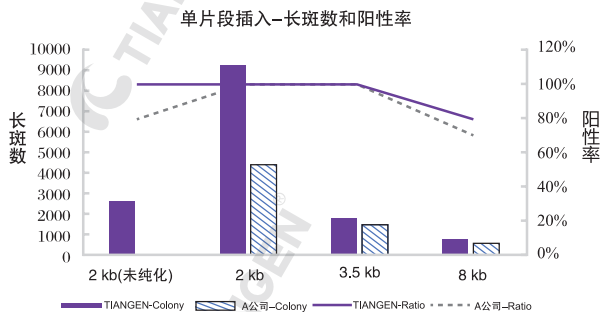


图 1. 使用天根 EasyGeno 及 A 公司同类产品分别将单个 DNA 片段重组进入 pUC19。所使用的片段分别为 2 kb、3.5 kb 和 8kb 的片段，横坐标为 DNA 插入片段长度。

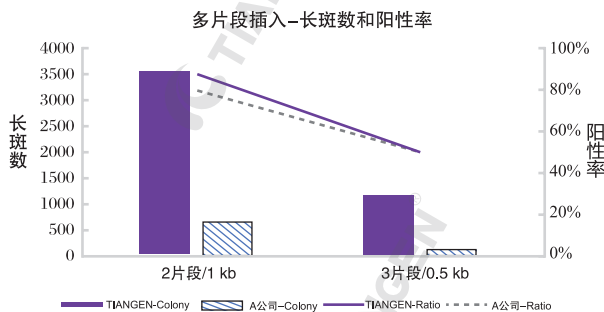
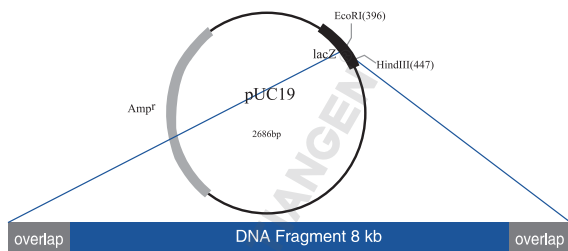


图 2. 使用天根 EasyGeno 及 A 公司同类产品分别将 2 个和 3 个 DNA 片段同时重组进入 pUC19。所使用的片段分别为 2 个 1 kb 的 DNA 片段和 3 个 0.5 kb 的 DNA 片段，横坐标为 DNA 插入片段长度。

实例 1: 8 kb 片段定向重组进入 pUC19 载体

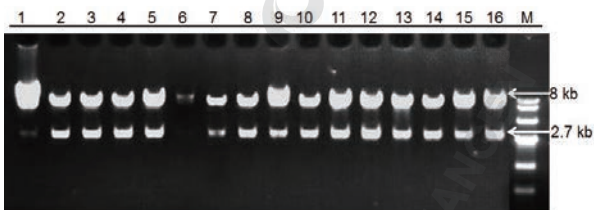


pUC19 载体经 EcoRI 和 HindIII 限制性内切酶线性化，插入片段与线性化载体间带有 15 bp 的重叠序列。重组后转化感受态细胞。从平板中随机挑取菌落于 LB 培养基中振荡培养，阳性克隆酶切产生 8 kb 的目的带。提取各个菌株的质粒，并进行 EcoRI 和 HindIII 双酶切鉴定。

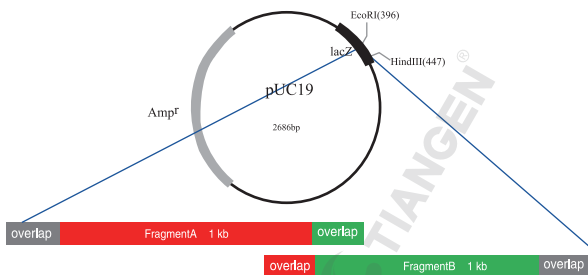
重组后长斑及阳性率结果

产品	长斑数	阳性率
EasyGeno	840	87.5%

重组后质粒酶切鉴定结果



实例 2: 两个 1 kb 片段串联重组进入 pUC19 载体

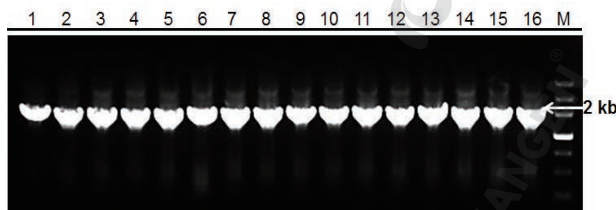


pUC19 载体经 EcoRI 和 HindIII 限制性内切酶线性化，片段 A 和片段 B 及线性化载体间均带有 15 bp 的重叠序列。重组后转化感受态细胞。从平板中随机挑取菌落进行菌落 PCR 鉴定，阳性克隆在 PCR 扩增后会获得约 2 kb 的条带。

重组后长斑及阳性率结果

产品	长斑数	阳性率
EasyGeno	3552	100%

重组后菌液 PCR 鉴定结果



EasyGeno Primer 在线引物设计工具

EasyGeno Primer 是为配合 EasyGeno 快速重组克隆试剂盒 (VI201) 所开发出的专用引物设计工具。使用软件时, 只需提供载体序列、插入 DNA 片段序列及数量、载体线性化的方式等信息, 即可获得用于引入重叠序列的 PCR 引物。软件具有中文 / 英文两个版本, 方便不同语种客户使用。

登录 TIANGEN 官网, 点击进入



选择载体线性化方式和插入片段个数, 输入载体和插入片段的序列。

TIANGEN 天根生化科技(北京)有限公司
TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD.

无缝克隆引物设计工具 使用说明及注意事项

EasyGeno Primer

载体线性化方式

- 单酶切线性化
- 双酶切线性化
- PCR扩增线性化

插入片段个数

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

生成引物 清空

请输入载体序列或多克隆位点序列:
(序列默认为5'至3'方向, 克隆位点上下游长度至少各 20 bp)

```
ATTGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGTCGATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGG
TTTGCGTATTGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGTTCGCTGCGGCGAGC
GGTACAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCAGAAATCAGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTG
AGCAAAAGGCCAGC
```

请选择线性化酶切位点(默认为5'至3'方向):

NotI XbaI

重组后是否保留酶切位点: 否 是

请输入每个插入DNA片段: (序列默认为5'至3'方向)

插入片段1

```
TGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCC
GGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG
ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGA
AGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTTGTATCCG
GCAAAACAAACCCCGTGGTAGCGGTGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGAT
```

点击 **生成引物**, 获得引物序列。

TIANGEN 天根生化科技(北京)有限公司
TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD.

无缝克隆引物设计工具 使用说明及注意事项

EasyGeno Primer

引物计算结果 (小写字母为5'端添加的重组序列):

插入片段1:

正向扩引物序列 (F), GC 55%, Tm 51.6°:

```
5' cactataggagagcggcgcgctgtaggctcttcgctccaagct 3'
```

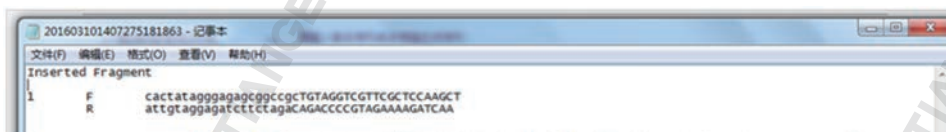
反向扩引物序列 (R), GC 45%, Tm 47.9°:

```
5' atttaggagatcttctagaCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA 3'
```

批量下载 返回

地址: 北京市海淀区西小口路66号东升科技园北领地C7-3 电话: 800-990-6057
京ICP备14016832 京公网安备11010802015027 天根生化科技(北京)有限公司 © 版权所有

点击 **批量下载**, 即可下载 *.txt 格式文件, 方便保存和拷贝引物。



Q&A 重组克隆常见问题分析

Q 重组产物转化感受态细胞后，无克隆或克隆数少？

A 克隆数量少可能有多方面原因：

1) 转化效率低。应使用新制备或妥善保存的感受态细胞，并且严格参照本产品建议的或其它常用的转化流程，确保转化效率 $>10^7$ cfu/ μ g（必要时请使用超螺旋质粒 pUC19 同步转化感受态细胞作为对照检测转化效率，即：将 0.1 ng pUC19 加入另一支感受态细胞管中，其余的操作步骤与连接产物的转化步骤同步进行）。重组反应产物的转化体积不应超过感受态细胞体积的 1/10。若平板完全无菌落生长，需检查培养基所添加抗生素与载体所携带的抗性基因是否一致或转化流程是否正确（如卡那抗性的质粒转化不应使用快速转化步骤）。

2) 重叠序列设计不合理，无法重组。应仔细检查引物设计是否符合本试剂盒引物设计的原则。使用本试剂盒片段间重叠序列长度一般建议 15 nt，不能少于 11 nt；并保证不同重叠序列间的序列唯一性。

3) 不纯的载体或片段抑制重组反应。若使用未纯化的 PCR 或酶切产物，加入未纯化 DNA 的体积不应超过重组反应体系总体积的 1/5。推荐采用胶回收或离心柱法纯化 DNA 后进行重组。

4) 产品过期，酶活性过低。本产品配方经过严格的活力和稳定性测试，但超出保质期或保存不当的产品可能导致重组效率降低。试剂盒中包含对照线性化的质粒和插入片段，用于检测 2 \times EasyGeno Assembly Mix 的效率。若按照本手册建立正对照后，用 pUC19 的任意一对通用测序引物（例如：M13F(-21) 5' -TGAAAACGACGGCCAGT-3' 和 M13 Reverse 5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3'）进行菌落 PCR 鉴定，扩增得到约 2 kb 插入片段的比例低于 50%，建议重新采购。

Q 重组后产物转化感受态细胞后，假阳性较多或阴性对照长斑较多？

A 阳性率低的原因主要有两个方面：

1) 多数克隆不含插入片段：制备线性载体时，残余的完整环状质粒（酶切法）或作为模版且未被分离或消化的质粒（PCR 法）都可经转化产生假阳性背景。调整酶切体系（如减少质粒用量、增加内切酶用量和延长酶切反应时间等）使酶切彻底、用 DpnI 消化 PCR 后的质粒模板、胶回收纯化 DNA 产物等均可有效减少质粒残留。

2) 克隆含有不正确的插入片段：若电泳检测载体或片段的 PCR 扩增产物混有非特异片段，应优化 PCR 体系提高特异性或胶回收纯化目的产物。若线性化载体不是由空载体酶切或扩增制备，而是基于已含有其他片段的载体进行改造，则不彻底酶切和模板质粒残留将使部分克隆中含有不正确的插入片段。应调整酶切体系、DpnI 消化模板或胶回收纯化以减少质粒残留。

Q 重叠序列长度对重组效率的影响？

A 15 nt 的重叠序列能够满足绝大部分载体和长度片段的重组。随着重叠序列的增长（15-40 nt），获得的克隆数逐步增加；重叠序列长度从 15 nt 增加到 20 nt 时，载体与插入片段间的重组效率增加约 8-10 倍。因此如进行较大载体（如 pCambia3301 载体，约 11 kb）重组时，可适当增加引物中重叠序列至 20 nt 或更长。

Q 载体和片段用量的最低极限是多少？

A 不同长度的载体及插入片段会有所差异。以 2 kb 片段重组进入线性化的 pUC19（约 2.7 kb）为例，10 μ l 反应体系，每个反应体系中 pUC19 最低用量为 6 ng，插入片段的用量为 10 ng。

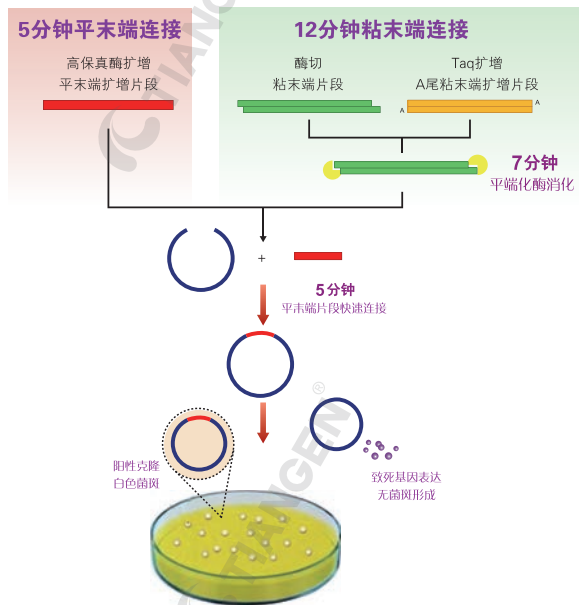
pLB 零背景快速克隆试剂盒

Lethal Based Fast Cloning Kit

— 无需蓝白斑筛选、灵敏高效地完成基因克隆

目录号	包装	价格
VT205-01	20 rxn	780 元
VT206-01	20 rxn	780 元

平 / 粘末端连接流程



产品简介

pLB 零背景快速克隆试剂盒是一种阳性选择克隆系统。试剂盒提供一种新颖的即用型阳性选择克隆载体 pLB，该载体含有致死基因，多克隆位点处插入外源片段会导致该基因失活，而自身环化的 pLB 载体则会表达致死的毒性蛋白。因此，转化后只有含有重组质粒的细菌才能存活形成克隆菌落，从而无需蓝白斑筛选。克隆位点两端均包含 Bgl II 酶切位点，可进行单酶切鉴定阳性克隆。

产品特点

- 方便：自连致死的零背景载体，无需蓝白斑筛选
- 快速：独特连接体系，5 分钟快速连接 ≤ 3 kb 片段
- 高效：菌落数多，阳性率接近 100%
- 灵敏：可实现浓度低至 0.05 pmol 及长至 8 kb 片段的高效连接
- 普适：包含高效平末端化酶，平 / 粘末端产物均可连接

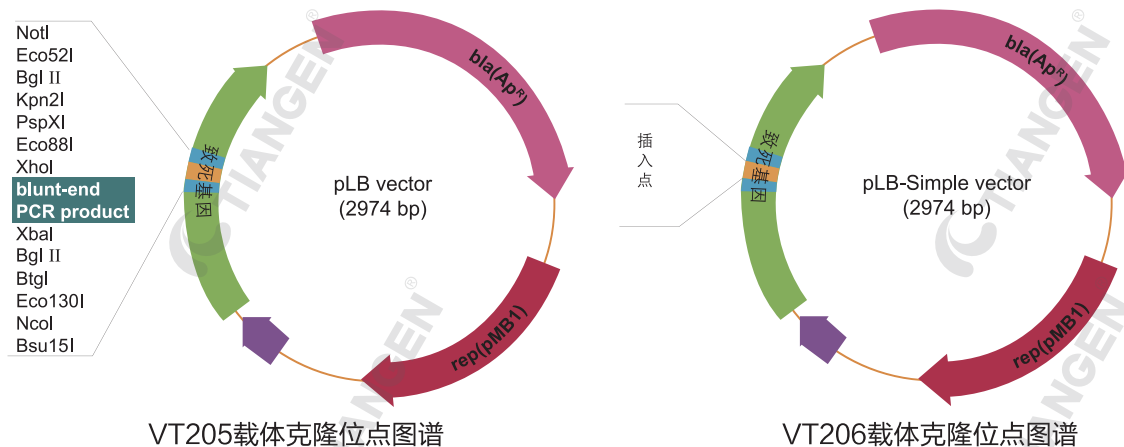
保存条件

-20°C 保存

自备试剂

感受态细胞，氨苄青霉素

pLB 载体克隆位点图谱



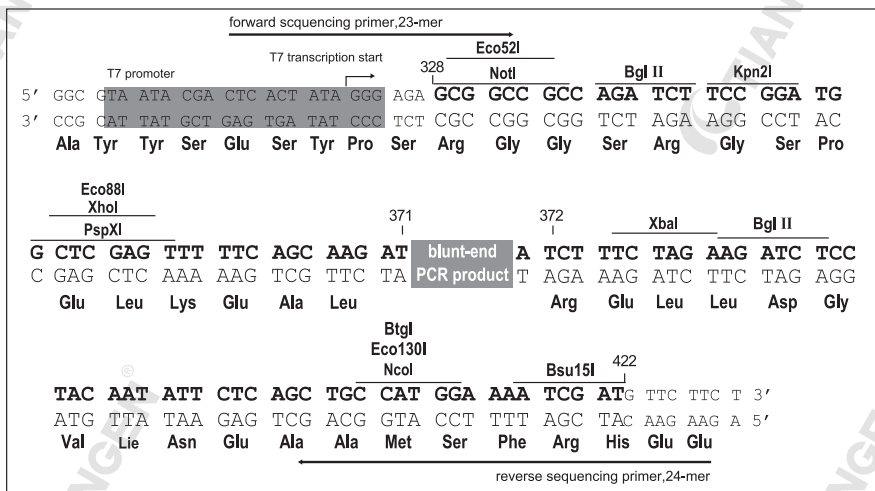
*VT206-01 包含 pLB-simple vector，插入位点处不包含多克隆位点。

六克隆点突变

产品包装

试剂盒组成	VT205-01	VT206-01
pLB Vector (35 ng/μl)	20 μl	20 μl
T4 DNA Ligase (3 U/μl)	20 μl	20 μl
2× Reaction Solution	100 μl	100 μl
Blunting Enzyme	10 μl	10 μl
pLB Vector Forward Sequencing Primer (10 μM)	200 μl	200 μl
pLB Vector Reverse Sequencing Primer (10 μM)	200 μl	200 μl
Control Insert DNA (700 bp, 50 ng/μl)	10 μl	10 μl
ddH ₂ O	1 ml	1 ml

酶切位点



六克隆 & 点突变

实验例

不同长度片段连接菌液检测结果图

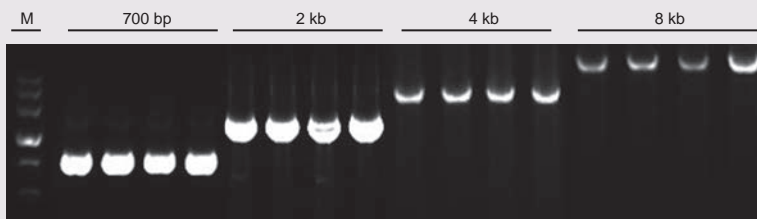


图 1. 连接不同大小片段的阳性率检测。700 bp 片段加入量为 12.5 ng, 2 kb 片段加入量为 23 ng, 4 kb 片段加入量为 100 ng, 8 kb 片段加入量为 300 ng。M: TIANGEN Marker III

长片段和低浓度片段的高效连接

平末端长片段连接——菌落数

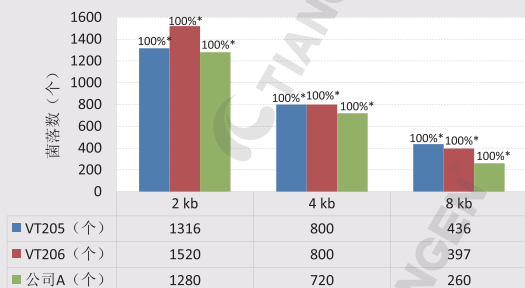


图 2. 平末端长片段连接菌落数。连接体系中, 载体加入 1 μl(35 ng), 片段与载体的摩尔比 7:1。≤ 3 kb 片段, 室温 (22℃) 连接 5 min; > 3 kb 片段, 室温 (22℃) 连接 30 min。* 百分数代表菌斑检测的阳性率。

粘末端低浓度片段连接——菌落数

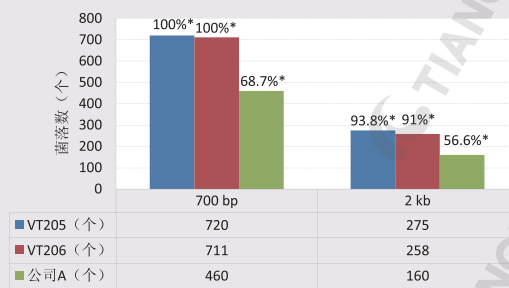


图 3. 粘末端低浓度片段连接菌落数。连接体系中, 700 bp 片段加入量 12.5 ng, 2 kb 片段加入量 23 ng, 片段与载体的摩尔比 1:1, 室温 (22℃) 连接 5 min。* 百分数代表菌斑检测的阳性率。

pGM-T 快速克隆试剂盒 pGM-T Fast Cloning Kit

—新型工艺制作的 5 分钟快速克隆试剂盒

目录号	包装	价格
VT207-01	20 rxn	390 元
VT207-02	60 rxn	980 元
VT307-01	20 rxn	500 元
VT307-02	60 rxn	1300 元

产品包装

试剂盒组成	VT207		VT307	
	20 次	60 次	20 次	60 次
pGM-T Fast Vector (50 ng/μl)	20 μl	60 μl	20 μl	60 μl
RapiLigation Mix(2×)	100 μl	3×100 μl	100 μl	3×100 μl
Control Insert DNA (688 bp) (50 ng/μl)	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl
DH5α (100 μl each)	-	-	10×100 μl	30×100 μl
Compcell Control Plasmid pUC19 (0.1 ng/μl)	-	-	10 μl	10 μl
ddH ₂ O	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

下游应用

片段克隆测序, 亚克隆等

保存条件

感受态细胞 -70℃ 保存, 其他试剂 -20℃ 保存

产品简介

pGM-T Fast Vector 是基于 pGM-T Vector 改良的一种快速克隆 Taq 扩增的 PCR 产物的专用 T 载体。pGM-T Fast Vector 在制作工艺上进行了改良, 采用新型的 XcmI 内切酶酶切, 产生末端 3' T 突出的线性化载体, 因此其克隆效率远高于传统酶切加尾法得到的 T 载体。试剂盒中配备的新型 RapiLigation Mix (目录号: RT407) 为快速的 T4 DNA 连接酶反应试剂, 其中含有连接增强剂及酶稳定剂, 可大大缩短连接时间, 提高 PCR 产物的连接和克隆效率。

产品特点

- 高阳性率: 全新载体制备工艺, 克隆数更多, 阳性率接近 100%。
- 快速连接: 配合使用新型 RapiLigation Mix, 5 min 快速连接片段。
- 灵敏高效: 可进行浓度低至 0.025 pmol 片段和长至 8 kb 片段的高效连接。
- 操作便捷: 只需加入载体和片段即可进行连接反应。

载体图谱

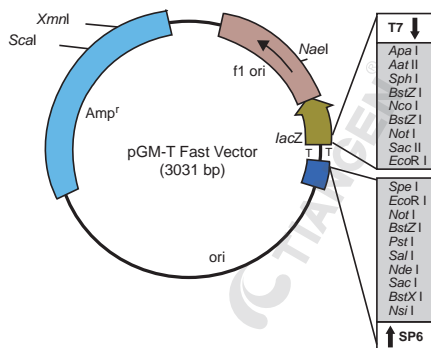


图 1 VT207/307 载体图谱

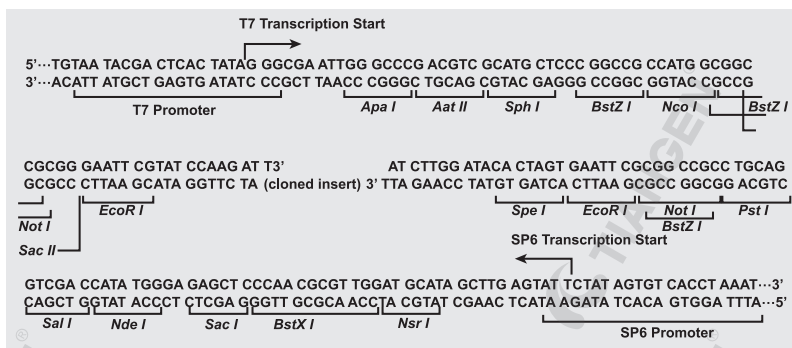


图 2 VT207/307 克隆位点序列

pGM-Simple-T 快速克隆试剂盒

pGM-Simple-T Fast Cloning Kit

—新型工艺制作的 5 分钟高效 TA 克隆试剂盒

目录号	包装	价格
VT208-01	20 rxn	390 元
VT208-02	60 rxn	980 元
VT308-01	20 rxn	500 元
VT308-02	60 rxn	1300 元

产品包装

试剂盒组成	VT208		VT308	
	20 次	60 次	20 次	60 次
pGM-Simple-T Fast Vector (50 ng/μl)	20 μl	60 μl	20 μl	60 μl
RapiLigation Mix(2×)	100 μl	3×100 μl	100 μl	3×100 μl
Control Insert DNA (688 bp) (50 ng/μl)	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl
DH5α(100 μl each)	-	-	10×100 μl	30×100 μl
Compcell Control Plasmid pUC19 (0.1 ng/μl)	-	-	10 μl	10 μl
ddH ₂ O	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

产品简介

pGM-Simple-T Fast 是基于 pGM-T Vector 改良的一种快速克隆 Taq 酶扩增的 PCR 产物的专用 T 载体。pGM-Simple-T Fast Vector 在制作工艺上进行了改良采用新型的 XcmI 内切酶酶切，产生末端 3' T 突出的线性化载体，因此其克隆效率高高于传统酶切加尾法得到的 T 载体。pGM-Simple-T Fast Vector 在克隆位点两端不包含 MCS 位点，因此更适合带有酶切位点的插入 DNA 的亚克隆，试剂盒中配备的新型 RapiLigation Mix (目录号: RT407) 为快速的 T4 DNA 连接酶反应试剂，其中含有连接增强剂及酶稳定剂，可大大缩短连接时间，提高 PCR 产物的连接和克隆效率。

产品特点

- 高阳性率：全新载体制备工艺，克隆数更多，阳性率接近 100%
- 快速连接：配合使用新型 RapiLigation Mix，5 min 快速连接片段
- 灵敏高效：可进行浓度低至 0.025 pmol 片段和长至 8 kb 片段的高效连接
- 操作便捷：不含 MCS 位点，更适合带有确切位点的插入 DNA 片段的亚克隆

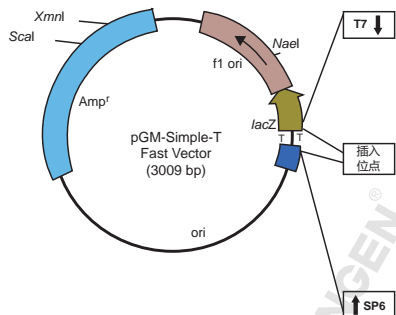
下游应用

片段克隆测序，亚克隆等

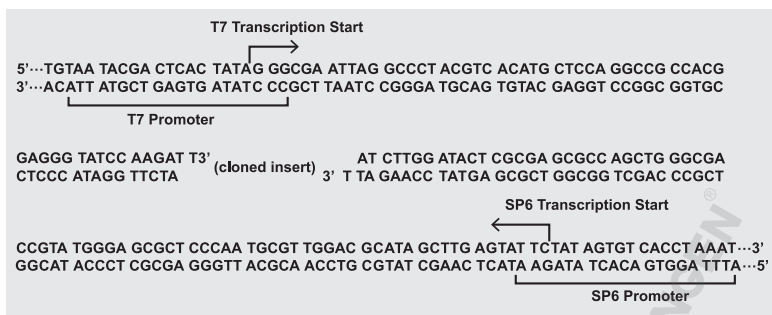
保存条件

感受态细胞 -70°C 保存，其他试剂 -20°C 保存

载体图谱



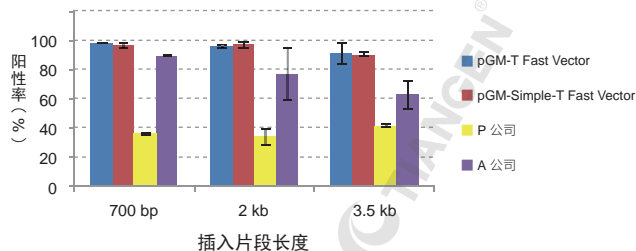
VT208/308 载体图谱



VT208/308 载体克隆位点序列

实验例

不同长度片段连接阳性率的比较

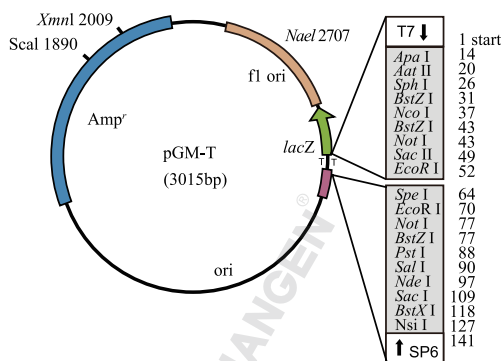


分别将 700 bp、2 kb 和 3.5 kb 的片段连接进入 pGM-T Fast Vector、pGM-simple-T Fast Vector 以及其他两家公司的 T-vector。按片段：载体摩尔比 3：1 比例加入片段和载体，连接温度及时间按相应产品说明书进行。纵坐标代表阳性率，横坐标代表插入片段长度。

pGM-T 载体相关试剂盒

目录号	产品名称	包装	价格
VT202-01	pGM-T 连接试剂盒	20 rxn	390 元
VT202-02	(含载体, 连接酶)	60 rxn	980 元
VT302-01	pGM-T 克隆试剂盒	20 rxn	500 元
VT302-02	(含载体, 连接酶, 感受态细胞)	60 rxn	1300 元
VT402	pGM-T 平末端 DNA 片段加 A 克隆试剂盒 (含加 A 液, 载体, 连接酶, 普通 DNA 产物纯化试剂盒, 感受态细胞)	20 rxn	650 元

pGM-T 载体克隆位点图谱图



产品简介

pGM-T 是高效克隆 PCR 产物的专用载体, 由克隆载体改建而成, 使多克隆位点两侧的 3' 端带 T。由于大部分耐热聚合酶反应时都会在 PCR 产物的 3' 端添加一个 A, 可与 pGM-T 载体 3' 端的 T 互补连接, 同时 3' T 突出端可以防止载体的自身环化, 因此可大大提高 PCR 产物的连接和克隆效率。pGM-T 载体包含有 T7 和 SP6 RNA 聚合酶启动子, 其侧端和多克隆位点区相接, 多克隆位点区位于 β 半乳糖苷酶的 α 肽编码区内。 α 肽插入失活使得菌落在指示培养基中呈现不同颜色, 可根据颜色直接筛选重组克隆, 白色克隆为阳性重组克隆, 蓝色的为载体自连的克隆 (具体筛选原理见分子克隆第三版)。

自备试剂

克隆实验需自备 IPTG、X-Gal、二甲基甲酰胺

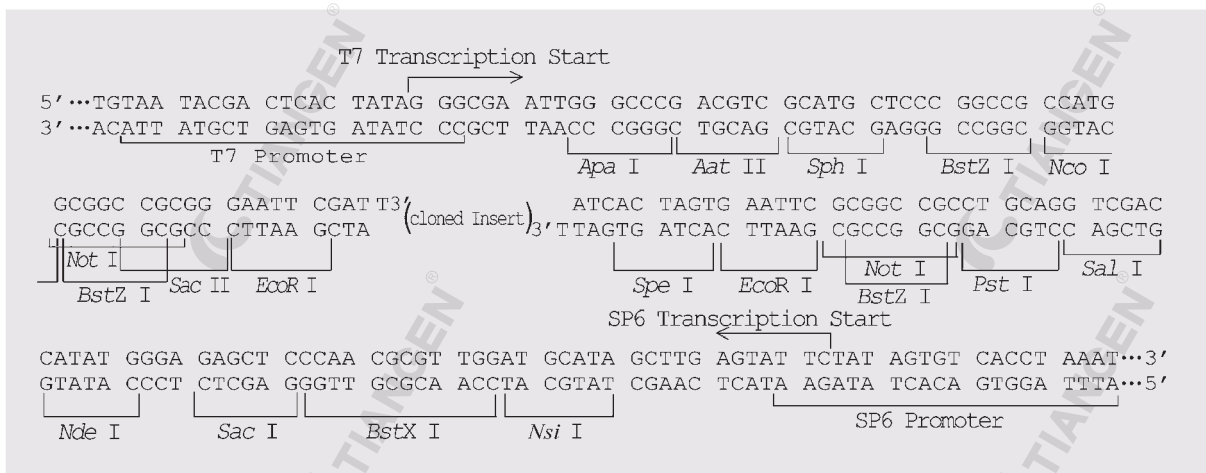
保存条件

-20°C 保存

感受态细胞: -70°C 保存

SOC 培养基: 2-8°C 避光保存

酶切位点



注: M13 Reverse Sequencing binding site 176-197 M13 Forward Sequencing binding site 2949-2972

pGM-T 连接试剂盒组成

试剂盒组成	VT202-01	VT202-02
pGM-T Vector (50 ng/μl)	20 μl	60 μl
T4 DNA Ligase (3 U/μl)	20 μl	3×20 μl
10×T4 DNA Ligation Buffer	30 μl	3×30 μl
2×T4 DNA Rapid Ligation Buffer	100 μl	3×100 μl
Control Insert DNA (700 bp) (50 ng/μl)	10 μl	10 μl
ddH ₂ O	1 ml	1 ml

pGM-T 连接试剂盒适用于 PCR 产物的克隆, 可将 PCR 产物连接到 pGM-T 载体上, 便于进行下一步实验。为了提高连接效率, 本试剂盒提供了两种连接缓冲液供不同情况选择: 10×Ligation Buffer I 适合置于 16°C 连接过夜, 可获得最佳连接效果; 2×Ligation Buffer II 为快速连接缓冲液, 25°C 连接 10 min 即可转化, 快捷方便。

pGM-T 克隆试剂盒组成

试剂盒组成	VT302-01	VT302-02
pGM-T Vector (50 ng/μl)	20 μl	60 μl
T4 DNA Ligase (3 U/μl)	20 μl	3×20 μl
10×T4 DNA Ligation Buffer	30 μl	3×30 μl
2×T4 DNA Rapid Ligation Buffer	100 μl	3×100 μl
Control Insert DNA (700 bp) (50 ng/μl)	10 μl	10 μl
TOP10 (100 μl/管)	10 管	30 管
Compcell Control Plasmid pUC19 (0.1 ng/μl)	10 μl	10 μl
ddH ₂ O	1 ml	1 ml

pGM-T 克隆试剂盒在 pGM-T 连接试剂盒的基础上增加了大肠杆菌感受态细胞。本试剂盒中配有 TOP10 感受态细胞, 转化效率达到 10⁸cfu/μg。

pGM-T 平末端 DNA 片段加 A 克隆试剂盒组成

试剂盒组成	VT402
pGM-T Vector (50 ng/μl)	20 μl
T4 DNA Ligase (3 U/μl)	20 μl
10×T4 DNA Ligation Buffer	30 μl
2×T4 DNA Rapid Ligation Buffer	100 μl
Control Insert DNA (700 bp) (50 ng/μl)	10 μl
TOP10 (100 μl/管)	10 管
Compcell Control Plasmid pUC19 (0.1 ng/μl)	10 μl
ddH ₂ O	1 ml
DNA 产物纯化试剂盒	20 次
Taq DNA Polymerase (2.5 U/μl)	50 μl
Tailing-A Reaction Buffer (5×)	200 μl

pGM-T 平末端 DNA 片段加 A 克隆试剂盒适用于平末端 DNA 片段的克隆, 如 Pfu 等高保真酶进行 PCR 反应时, 其扩增产物末端无 A, 无法直接与 T 载体连接, 如果直接使用平末端载体克隆, 效率非常低, 筛选困难。通过本试剂盒对平末端 DNA 片段 3' 末端加 A 后, 能够实现与 pGM-T 连接。此试剂盒也可用于常规的 TA 克隆。

感受态细胞

- 保存条件：-70℃保存
- TIANGEN 公司经过特殊工艺处理的感受态细胞具有转化效率高、批次间稳定性强的优势。
- 只适用于热激，不适合电转。

克隆感受态细胞

DH5α 感受态细胞

目录号	包装	价格
CB101-01	10×100 μl	160 元
CB101-02	20×100 μl	290 元

基因型： F⁻ ϕ 80*lacZ*ΔM15Δ(*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17* (*r_k⁻, m_k⁺*) *supE44*λ *thi-1 gyrA96 relA1 phoA*

特 点： DH5α 感受态细胞是一种常用于质粒克隆的感受态细胞，其 ϕ 80*lacZ* Δ M15 基因的产物可与 pUC 载体编码的 β-半乳糖苷酶氨基端实现 α 互补，可用于蓝白斑筛选，转化效率高达 10⁸cfu/μg。*recA1* 和 *endA1* 的突变有利于克隆 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取。

TOP10 感受态细胞

目录号	包装	价格
CB104-01	10×100 μl	160 元
CB104-02	20×100 μl	290 元

基因型： F⁻ *mcr*Δ(*mrr-hsd RMS-mcr BC*) ϕ 80*lacZ*ΔM15Δ*lac X74 recA1 ara*Δ139Δ(*ara-leu*) 7697*galU galK rpsL* (*Str^r*) *endA1 nupG*

特 点： TOP10 感受态细胞转化效率高达 10⁸cfu/μg，具链霉素抗性，其转化后单菌落的生长数多，生长速度比 DH5α 略快，相同培养时间内生长的菌斑略大于 DH5α。适用于高效的 DNA 克隆和质粒扩增。能保证高拷贝质粒的稳定复制。

表达感受态细胞

BL21 (DE3) 感受态细胞

目录号	包装	价格
CB105-01	5×100 μl	200 元
CB105-02	10×100 μl	280 元

基因型： F⁻ *ompT hsdS_B*(*r_B⁻ m_B⁻*) *gal dcm*(DE3)

特 点： 该感受态细胞用于以 T7 RNA 聚合酶为表达系统的高效外源基因的蛋白表达宿主。T7 噬菌体 RNA 聚合酶基因的表达受控于 λ 噬菌体 DE3 区的 *lacUV5* 启动子，该区整合于 BL21 的染色体上。该菌适合于非毒性蛋白的表达。转化效率可达 10⁷cfu/μg。

BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞

目录号	包装	价格
CB106-02	10×100 μl	280 元

基因型： F⁻ *ompT hsdS_B*(*r_B⁻ m_B⁻*) *gal dcm*(DE3)pLysS *Cam^r*

特 点： 该感受态细胞带有一段表达氯霉素抗性蛋白的基因，适合于毒性蛋白和非毒性蛋白的表达，转化效率可达 10⁷cfu/μg。此质粒含有表达 T7 溶菌酶的基因，T7 溶菌酶能够降低目的基因的背景表达水平，但不干扰 IPTG 诱导的表达。

Rosetta(DE3) 感受态细胞

Rosetta(DE3) competent *E.coli*

——适合含稀有密码子的真核基因表达的感受态细胞

目录号	包装	价格
CB108-02	10×100 μl	280 元

产品包装

试剂盒组成	CB108-02
Rosetta(DE3)	10×100 μl
CompCell Control Plasmid pUC19 (0.1 ng/μl)	10 μl

保存条件

-70°C保存

下游应用

适用于含有稀有密码子的基因表达

产品简介

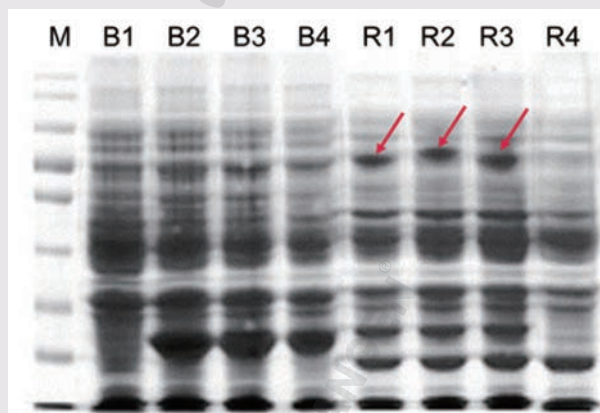
Rosetta 感受态由 BL21 衍生而来，通过相容性氯霉素抗性质粒补充了表达大肠杆菌缺乏的 6 种稀有密码子（AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA）tRNA 的基因，避免了真核基因中大肠杆菌稀有密码子的高使用频率所导致的表达限制。本产品采用进口大肠杆菌，经特殊工艺制备，可用于 DNA 的化学转化，转化效率可达 10^7 cfu/μg DNA，菌株具有氯霉素抗性。

基因型：F- *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)gal dcm(DE3) pRARE(argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL)(Cam^r)*。

产品特点

- 整合大肠杆菌缺乏的 6 种密码子 tRNA 基因，更适合真核基因的表达
- 适合非毒性蛋白的表达（毒性蛋白请选择 BL21(DE3)plysS 感受态细胞 CB106）

实验例



含有稀有密码子基因的 *Mx* 蛋白表达的 SDS-PAGE 结果

Rosetta 成功表达含有稀有密码子频率为 9.8% 的 *Mx* 基因，一个约 75 kd 的蛋白质，而 BL21 菌株则没有相应蛋白的表达（红色箭头处为 75kd 的 *Mx* 蛋白）。Lane B1, R4 分别为 BL21 和 Rosetta 菌株裂解液 SDS-PAGE 电泳结果；Lane B2-4 为转化了 pET30a-*Mx* 质粒的 BL21 菌株裂解液 SDS-PAGE 电泳结果；Lane R1-3 为转化了 pET30a-*Mx* 质粒的 Rosetta 菌株裂解液 SDS-PAGE 电泳结果。M 为蛋白 marker

T-Fast 感受态细胞

T-Fast competent *E. coli*

——质粒得率高、生长速度快的感受态细胞

目录号	包装	价格
CB109-02	20×100 μl	320 元

产品包装

试剂盒组成	CB109-02
T-Fast	20×100 μl
Compcell Control Plasmid	
pUC19 (0.1 ng/μl)	10 μl

产品特点

- 快速生长：菌株生长快速，涂布于琼脂平板后 6 h 可见菌落，8 h 可挑取单克隆菌落；过夜培养的单克隆菌落于 3 ml 液体 LB 培养基中培养 4 h 即可用于质粒提取。
- 快速转化：适用于 Amp^r 载体的 5 min 快速转化流程。
- 高质粒得率：相同 OD₆₀₀ 条件下，T-Fast 感受态细胞质粒得率高于 DH5α 20%。
- 高阳性率：携带 lacI^q 基因，可更严谨的控制 Lac 启动子的开启，从而提高蓝白斑筛选的阳性率。

产品简介

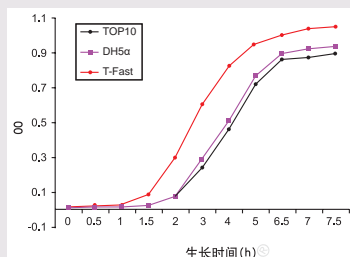
本产品源于 *Escherichia coli* K12 菌株，是一种生长快速的菌株。T-Fast 感受态细胞中突变的 $\Delta lacZM15$ 基因产物与载体携带的 β -半乳糖苷酶基因表达产物实现 α 互补，适用于菌落蓝白斑筛选，*lacI^q* 基因更严谨的控制 Lac 启动子的开启，从而极大的降低了蓝白斑筛选中的假阳性率。此外，T-Fast 感受态细胞中 *endA1* 的突变有利于克隆 DNA 的稳定和高纯度质粒 DNA 的提取，且质粒得率要高于其他常用克隆菌株。本产品经特殊工艺处理，可用于 DNA 的化学转化，转化效率可达 10⁸ cfu/μg DNA，本菌株具有 T1 噬菌体抗性 (*fhuA2*)。基因型：

F' proA⁺ B⁺ lacI^q ΔlacZM15 / fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10) Tet^S endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5

下游应用

DNA 化学转化

实验例



过夜培养的菌液调整 OD₆₀₀ 至一致，以 1:100 的比例接种于 LB 液体培养基，每 0.5-1 h 测定一次 OD₆₀₀，每次三个重复。

图 1. 三种感受态细胞生长曲线对比

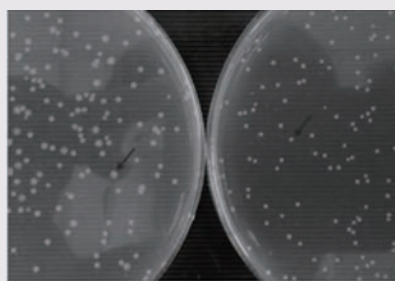


图 2. 过夜培养菌落的生长情况比较 (12 h)

表 1. 两种感受态细胞提取 pET30a 质粒得率对比

菌株	菌液浓度 (OD ₆₀₀)	平均菌液浓度 (OD ₆₀₀)	质粒浓度 (ng/μl)	平均质粒浓度 (ng/μl)	平均质粒浓度 (ng/OD ₆₀₀)
DH5α	0.618	0.612	58.5	54.8	89.5
	0.615		57.6		
	0.603		48.3		
T-Fast	0.678	0.675	76.9	76.7	113.6
	0.667		69.3		
	0.681		77.8		

大肠杆菌基因型

hsdR

有利于非甲基化 DNA (如 PCR 扩增产物) 的有效转化

mcrA

有利于甲基化 DNA (如基因组) 的有效转化

lacZΔM15

用于蓝白斑筛选

endA1

无 Endonuclease I 酶活性, 有利于质粒的纯化

recA1

减少克隆 DNA 的非特异性重组

DE3

编码 T7 RNA 聚合酶, 用于诱导 T7- 启动的表达系统的表达。

deoR

可以高效吸收大片段 DNA, 有利于文库的构建。

Tn10

含有四环素抗性的转座子

ompT

表明大肠杆菌缺乏外膜蛋白酶。缺乏外膜蛋白酶的菌株可以降低表达的外源蛋白在细菌中被降解的程度, 有利于获得完整的重组蛋白。

pLys

含编码 T7 溶菌酶的质粒; 通过抑制 T7 RNA 聚合酶的基础表达水平来降低 T7 启动的表达体系的基础表达水平。

argF

由于突变细菌不能利用 arginine。

F'

一个低拷贝可移动的质粒, 当被 M13 噬菌体侵染时, 可产生单链 DNA。

lacI

编码 lac 抑制子, 用于蓝白斑筛选时需加入 IPTG, 才可启动表达 β-gal。

pRARE(*argU, argW, ilex, glyT, leuW, proL*)

补充了大肠杆菌缺乏的 6 种稀有密码子 (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA) tRNA, 避免了真核基因中大肠杆菌稀有密码子高频使用时导致的表达限制。

lacI^f

lacI^f gene 编码的是 tac 启动子区的操纵子的抑制蛋白 tac (色氨酸乳糖乳糖启动子), 防止外源基因在没有 IPTG 情况下的本底表达, 使得蓝白斑筛选更加严格。

Antibiotic Usage List

Geneticin

Yeast : 200-300 µg/ml

Insect cells: 500-700 µg/ml

Mammalian cells: 50-2500 µg/ml

Zeocin

E. coli: 25-50 µg/ml

S. cerevisiae: 50-300 µg/ml

P. pastoris: 300 µg/ml

Insect cells: 300-600 µg/ml

Mammalian cells: 50-1000 µg/ml

Ampicillin

E. coli: 50-100 µg/ml

Tetracycline

E. coli: 50-100 µg/ml

Kanamycin

E. coli: 50 µg/ml

Chloramphenicol

E. coli: 25-170 µg/ml

Carbenicillin

E. coli: 20-60 µg/ml

Streptomycin

E. coli: 10-50 µg/ml

Actinomycin

E. coli: 25-100 µg/ml

Gentamicin

E. coli: 5-10 µg/ml

Blasticidin

E. coli: 50 µg/ml

S. cerevisiae: 5-100 µg/ml

P. pastoris: 250-300 µg/ml

Insect cells: 10-80 µg/ml

Mammalian cells: 2-25 µg/ml

Hygromycin

E. coli: 50 µg/ml

Yeast: 50-200 µg/ml

Insect cells: 200-400 µg/ml

Mammalian cells: 50-1000 µg/ml

Q&A 克隆常见问题分析

Q 转化后无克隆产生

- A-1** 转化失败或感受态细胞失活
- 做转化对照，保证感受态细胞的效率。
 - 做插入片段对照，确认载体有无问题。

Q 插入对照 DNA 片段的阳性率低

- A-1** 连接反应效率低
- 连接缓冲液含有 ATP，反复冻融 ATP 易降解。使用一次性分装的缓冲液，避免其反复冻融。
- A-2** T 突出端丢失
- 避免核酸外切酶的引入，降解 T 突出端。只使用无外源核酸酶活性的 T4 连接酶。
- A-3** 连接温度不适合
- 建议 16°C 过夜，选用 10×buffer。
- A-4** PCR 产物中含有抑制连接的成分
- 将 PCR 产物和连接反应对照混合，观察是否存在抑制效应。如怀疑有抑制成分存在，应重新纯化 PCR 产物。

Q PCR 产物连接转化后白色菌落数很少或根本没有

- A-1** PCR 产物没有 3' A 突出端，不能连接
- 并非所有 DNA 聚合酶都产生 3' A 突出端，如 Pfu 酶的 PCR 产物为平端。平端 PCR 产物可先通过聚合酶及 dATP 进行加尾反应产生 3' A 突出端，再与 T 载体连接。
- A-2** PCR 产物存在嘧啶二聚体，不能连接
- 尽量缩短 DNA 在紫外灯下照射的时间，尽量使用长波长紫外光源观察 PCR 产物。
- A-3** PCR 产物已经插入，但未破坏 lacZ 基因的翻译框
- 一般插入片段较短（小于 500 bp）时，插入片段可能没有影响 lacZ 基因的读码框，蓝色菌落可能含有插入片段。
- A-4** 插入片段与载体连接比例不理想
- 凝胶电泳检测 PCR 产物的完整性及浓度，优化插入片段与载体的摩尔比例。
- A-5** 连接的 PCR 片段中可能有引物二聚体
- 引物二聚体可连接到 TA 载体中，因为它们很小，所以酶切消化后电泳检测看不到带，看起来载体中没有插入。和背景对照相比，连接产生较多蓝色克隆。PCR 产物需要重新进行凝胶纯化。
- A-6** 培养基及其平板放置时间过长
- 配制新的培养基和平板。

Q PCR 连接转化后只产生白色克隆**A-1** 氨苄失活，因而氨苄敏感菌可生长

——检查氨苄平板是否正常制备并在一个月内使用。

A-2 平板不适合蓝白斑筛选

——检测背景对照，如果克隆菌不是蓝色的，检查平板是否含有氨苄 /IPTG/X-Gal 以及是否新鲜。如平板有问题，重新制备新鲜平板。

Q 阳性克隆少**A-1** PCR 片段很多没有 A 尾

——将 PCR 产物纯化后进行加尾反应。样品纯化后进行连接反应。

A-2 插入片段与载体的摩尔比例不理想

——凝胶电泳检测 PCR 产物的完整性及产量，优化插入片段量。

A-3 感受态细胞的转化效率低

——转化对照质粒，检查感受态细胞的转化效率。

Q 为什么每次做转化后菌落 PCR 有带，但是提质粒后 PCR 无条带？**A-1** 这个结果是典型的假阳性加 DNA 被污染。一般来说，菌液 PCR 是很容易有条带的，未连接的目的片段在做转化的时候一并被涂到了平板上，虽然微量，但仍然可以被扩增出。这就是为什么重组的载体必须要用酶切鉴定才能确定目的基因的插入。至于插入的目的基因成了别的，那就是典型的污染。应该是载体自身重组了，看看测序后的得到序列，很可能是载体序列的一部分。菌落 PCR 最重要的是选引物。不能选都在一个片段上的引物，建议做一个阴性对照看看引物合不合适。**Q 零背景快速连接试剂盒推荐片段用量？****A-1** pLB 和 pLB-Simple 载体与片段的摩尔比控制在 1:3-1:10，对于 1 kb 以下的片段建议使用 1:3 的比例，1 kb 以上的片段建议使用 1:7 的比例。

连接体系中 35 ng 的载体，不同大小的 PCR 产物最佳加入量举例如下：

PCR 产物长度 (bp)	最佳的使用量 (ng)
700 bp	25 ng
2000 bp	168 ng

快速定点突变试剂盒

Fast Site-Directed Mutagenesis Kit

——快速在目标载体上对靶基因进行单点或多点突变

目录号	包装	价格
KM101	20 rxn	1300 元

产品包装

试剂盒组成	20 次
FastAlteration DNA Polymerase (1 U/μl)	20 μl
5× FastAlteration Buffer	200 μl
Dpn I restriction enzyme(20 U/μl)	20 μl
4.5 kb Control plasmid(5 ng/μl)	40 μl
Control primers(5 μM, each)	80 μl
FDM competent cells	20×50 μl

保存条件

-20°C保存

FDM competent cells: -70°C保存

产品简介

体外定点突变技术是当前生物、医学各领域研究中的一种重要实验手段，多用于改造、优化目的基因；探索启动子的调节位点；以及研究蛋白质结构和功能之间的复杂关系。本试剂盒采用目前领先技术，可在目标载体上直接对靶基因进行单点突变，多点突变及插入或缺失突变，并且单点突变的突变率可达 90% 以上。另外，与以往的突变试剂盒需要多轮 PCR 及亚克隆等耗时耗力的步骤不同，本试剂盒的操作更为简便，从未突变菌株到突变菌株的构建只需要 4 步。

产品特点

- 简便快速：试剂盒采用非链取代式质粒扩增技术，只需 4 步即可实现由非突变菌株到突变菌株的转变，而不需要多轮 PCR 及亚克隆等耗时耗力的步骤。
- 高效引物：试剂盒采用部分重叠的引物设计原则，可以扩增得到更多的突变质粒。
- 应用广泛：本试剂盒不但可进行单点突变，还可以进行多点突变，且突变点数可达 5 个。
- 适应性强：本试剂盒最大可对 10 kb 的质粒进行定点突变，基本覆盖所有常用质粒。
- 突变率高：本试剂盒具有体外和体内双重消化甲基化质粒模板的功能，可以保证更高的突变率

点突变反应体系配制及反应程序

- 在进行单引物多位点突变时，由于增加了突变位点个数，所以突变率较单点突变时会有所降低，根据我们的实验数据，当突变位点个数达到 5 个时，突变阳性率会降低到 50%。因此建议客户要增加验证的克隆子数。
- 本试剂盒支持多引物多位点突变，这样可以在基因内更广泛的范围内同时进行突变实验。突变位点个数的上限仍然是 5 个。
- 建议在进行新的突变实验时要带上试剂盒附带的对照质粒和引物，以便于对实验问题进行分析。

组成成分	50 μl 体系
DNA Template	10~100 ng
正向突变引物 (10 μM)	2 μl
反向突变引物 (10 μM)	2 μl
5× FastAlteration Buffer	10 μl
FastAlteration DNA Polymerase (2.5 U/μl)	1.5 μl
RNase-Free ddH ₂ O	至 50 μl

反应程序

阶段	循环	温度	时间	内容
预变性	1×	95°C	2 min	预变性
PCR 反应	18×	94°C	20 sec	变性
		55°C	10 sec	退火
		68°C	2.5 min	延伸
补充延伸	1×	68°C	5 min	补充延伸
模板消化		37°C	1 h	Dpn I 消化质粒模板

快速连接反应预混液 RapiLigation Mix

——用于 DNA 快速连接的 T4 DNA 酶预混液

目录号	包装	价格
RT407-01	100 μ l	120 元
RT407-02	3 \times 100 μ l	300 元

产品包装

试剂盒组成	RT407-01	RT407-02
RapiLigation Mix (2 \times)	100 μ l	3 \times 100 μ l
ddH ₂ O	1 ml	5 ml

Rapiligation Mix

T4 DNA 连接酶	0.6 U/ μ l
Tris-HCl (pH8.0)	100 mM
MgCl ₂	20 mM
DTT	20 mM
ATP	2 mM
10%PEG4000 等其它稳定剂和增强剂	

保存条件

-20 $^{\circ}$ C 保存

产品简介

本产品是一种新型高效的 T4 DNA 连接酶预混液，RapiLigation Mix 中包含基本的反应缓冲液、连接增强剂以及独特的酶保护剂和稳定剂，浓度为 2 \times 。具有高效快速、灵敏广泛、操作便捷等优点，可大大缩短连接时间、提高 PCR 产物的连接和克隆效率。

适用范围

- 平末端的连接：平末端酶切出的载体与高保真聚合酶，扩增得到的 PCR 产物间的连接
- 粘末端的连接：粘末端酶切出的载体与基因片段间的连接
- T 载体的连接：T 载体与 Taq 等聚合酶扩增得到的带 3' A 末端片段间的连接

平板涂布玻璃珠 (无菌) TIANGEN ColiPlate Glass Beads

——10 秒钟完成多板涂布的高性价比菌液涂布工具

目录号	包装	价格
GB101-01	100 g	200 元

产品简介

本产品提供了一种高效快速的菌液（大肠杆菌、酵母菌等）涂布方法。平板涂布玻璃珠（直径 4 mm）光滑均匀，表面经特殊工艺处理，不残留菌液。与传统方法比较，使用平板涂布玻璃珠，菌液涂布更加均匀，能够覆盖传统涂菌方法不能达到的平板边缘。平板涂布玻璃珠可经反复灭菌，多次使用。

保存条件

置于室温（15-25 $^{\circ}$ C）干燥条件下

产品特点

平板涂布玻璃珠	玻璃棒
<ul style="list-style-type: none"> ● 10 sec 快速涂板，涂布均匀度高 ● 能够实现多板同时涂布 ● 能够高温高压灭菌，不易破碎 ● 高性价比 ● 无菌包装，直接使用 	<ul style="list-style-type: none"> ● 涂板时间长至少 1 min ● 不能实现多板同时涂布 ● 能够高温高压灭菌，但易碎 ● 性价比一般 ● 使用前需高温高压灭菌

产品图片



部分使用 TIANGEN 克隆系统相关产品发表的文献列表

题目	期刊	IF	使用产品	单位
Arabidopsis FLL2 promotes liquid-liquid phase separation of polyadenylation complexes	Nature	43.07	BL21 (DE3) 感受态细胞	清华大学
A Translation-Activating Function of MIWI/piRNA during Mouse Spermiogenesis	Cell	36.216	TOP10/BL21(DE3) 感受态细胞	中科院上海生化细胞所
Molecular Basis of Arthritogenic Alphavirus Receptor MXRA8 Binding to Chikungunya Virus Envelope Protein	Cell	36.216	DH5 α 感受态细胞	中科院北京生命科学研究所
The Mitochondrial Unfolded Protein Response Is Mediated Cell-Non-autonomously by Retromer-Dependent Wnt Signaling	Cell	36.216	DH5 α 感受态细胞	中科院遗传所
Tumor-Induced Generation of Splenic Erythroblast-like Ter-Cells Promotes Tumor Progression	Cell	36.216	Rosetta (DE3) 感受态细胞	第二军医大学
Rewiring of the Fruit Metabolome in Tomato Breeding	Cell	36.216	pLB Vector 零背景快速连接试剂盒	中国农科院深圳农业基因组所 / 华中农业大学
A Structural Change in Butyrophilin upon Phosphoantigen Binding Underlies Phosphoantigen-Mediated V γ 9V δ 2 T Cell Activation	Immunity	21.522	BL21 (DE3) 感受态细胞	清华大学
Zona incerta GABAergic neurons integrate pre-related sensory signals and induce an appetitive drive to promote hunting	Nature Neuroscience	21.126	pGM-T Vector 快速克隆试剂盒	上海科技大学
Destabilization of linker histone H1.2 is essential for ATM activation and DNA damage repair	Cell Research	17.848	BL21 (DE3) 感受态细胞	北京大学医学部 / 深圳大学医学院
A pannexin 1 channelopathy causes human oocyte death	Science Translational Medicine	17.161	pGM-T Vector 快速克隆试剂盒	复旦大学中山医院
Histone Modifications Regulate Chromatin Compartmentalization by Contributing to a Phase Separation Mechanism	Molecular Cell	14.548	BL21 (DE3)/ Rosetta (DE3) 感受态细胞	清华大学
Pacer Is a Mediator of mTORC1 and GSK3-TIP60 Signaling in Regulation of Autophagosome Maturation and Lipid Metabolism	Molecular Cell	14.548	Rosetta (DE3) 感受态细胞	浙江大学医学院
Nuclear Receptor Nur77 Facilitates Melanoma Cell Survival under Metabolic Stress by Protecting Fatty Acid Oxidation	Molecular Cell	14.548	DH5 α /BL21 (DE3) 感受态细胞	厦门大学
Neural Stem Cells Behave as a Functional Niche for the Maturation of Newborn Neurons through the Secretion of PTN	Neuron	14.403	DH5 α 感受态细胞	中科院遗传所
PDGFR β Cells Rapidly Relay Inflammatory Signal from the Circulatory System to Neurons via Chemokine CCL2	Neuron	14.403	DH5 α 感受态细胞	中科院神经所
Viperin catalyzes methionine oxidation to promote protein expression and function of helicases	Science Advances	12.804	快速定点突变试剂盒	武汉大学
Structural insights into the EGO-TC-mediated membrane tethering of the TORC1-regulatory Rag GTPases	Science Advances	12.804	BL21 (DE3) 感受态细胞	中科院上海生化细胞所
Protein lysine de-2-hydroxyisobutyrylation by CobB in prokaryotes	Science Advances	12.804	BL21 (DE3) 感受态细胞	天津医科大学
TRIM66 reads unmodified H3R2K4 and H3K56ac to respond to DNA damage in embryonic stem cells	Nature Communications	11.878	pLB Vector 零背景快速连接试剂盒	安徽科技大学
Expanding C-T base editing toolkit with diversified cytidine deaminases	Nature Communications	11.878	TOP10 感受态细胞	中科院上海神经所
The conserved 3' UTR-derived small RNA NarS mediates mRNA crossregulation during nitrate respiration	Nucleic Acids Research	11.147	DH5 α 感受态细胞	复旦大学上海医学院
Archaeal NSUN6 catalyzes m ⁵ C72 modification on a wide-range of specific tRNAs	Nucleic Acids Research	11.147	Rosetta (DE3) 感受态细胞	中科院上海生化细胞所
A Brassica miRNA Regulates Plant Growth and Immunity through Distinct Modes of Action	Molecular Plant	10.812	快速定点突变试剂盒 / pGM-T Vector 快速克隆试剂盒	中科院微生物所
Arabidopsis ECAP Is a New Adaptor Protein that Connects JAZ Repressors with the TPR2 Co-repressor to Suppress Jasmonate-Responsive Anthocyanin Accumulation	Molecular Plant	10.812	Rosetta (DE3) 感受态细胞	中国农业大学
Novel lncRNA-IUR suppresses Bcr-Abl-induced tumorigenesis through regulation of STAT5-CD71 pathway	Molecular Cancer	10.679	pLB Vector 零背景快速连接试剂盒	中科院微生物所 / 福建农林大学