

Version: AK 3.2 (2021.04.01修订)

Spark Universal T-Vector PCR Identification Kit

目录号: AK1001

01/产品组分

序号	组分	AK1001
		400 rxn
1	2×Spark Taq PCR Master Mix	5 mL
2	Universal Primer F	250 µL
3	Universal Primer R	250 µL
4	ddH ₂ O	5 mL

02/保存条件

本试剂盒于-20℃保存。

03/产品概述

菌落 PCR 鉴定是 T 载体克隆连接后鉴定是否有阳性克隆（含插入片段）最方便快捷的方法。但市面上常见的菌落 PCR 鉴定试剂盒采用的都是 T3, T7 或 SP6 等特异 T 载体引物，只能用于某种特定 T 载体连接阳性克隆的鉴定。若使用不同 T 载体，便需同时购买多种鉴定试剂盒，大大增加了使用成本。本产品采用通用 T 载体引物研制的通用 T 载体菌落 PCR 鉴定试剂盒，只需购买一种试剂盒，便可用于市面上所有常见的 T 载体（包括 pGEM, pUC, pBlueScript 系列）连接阳性克隆的鉴定。此外，采用 T3, T7 或 SP6 做引物的菌落 PCR 鉴定试剂盒引物距离插入位点的距离非常短，因此在鉴定 100 bp 左右或更小片段的插入时，阴性克隆的引物二聚体条带和阳性克隆扩增条带大小接近，无法区分。往往把引物二聚体的条带看成是阳性扩增条带，造成假阳性。本试剂盒通用 T 载体引物在未插入片段时的距离至少有 150 bp 以上，加上插入片段的长度，可以清晰的区分是插入片段扩增出的条带还是引物二聚体扩增出的条带。避免假阳性或假阴性，大大提高了准确性。本产品为一管便携式 PCR Master Mix 预混系统，直接加入需筛选的单菌落，经过 1 h 左右的 PCR 反应和电泳检测即可得

到重组菌落鉴定的结果。

04/预期扩增片段

T 载体名称	载体来源	未插入片段时通用 T 载体引物间距离	预期扩增片段长度 (以插入 300 bp 片段举例)
pGEM-T Easy	pGEM	281 bp	581 bp
pGEMX-T Easy	pGEM	289 bp	589 bp
pMD18-T	pUC18	158 bp	458 bp
pMD19-T	pUC19	158 bp	458 bp
pSURE-T	pUC19	239 bp	539 bp
pUCm-T	pUC19	239 bp	539 bp
pBLUE-T	pBluescript	300 bp	600 bp

05/操作步骤

- 按如下体系配制含有引物的 1×Taq Master Mix 反应液：

Components	Volume
2×Spark Taq PCR Master Mix	12.5 μL
Universal Primer F (10 μM)	0.5 μL
Universal Primer R (10 μM)	0.5 μL
ddH ₂ O	11.5 μL

- 将过夜培养后平板上的菌落编号，使用灭菌枪头挑取一部分单菌落加入上述反应液，吹打混匀使菌落充分分散到反应液中。

▲可多设置一管不加菌落的阴性对照，以便于分析实验结果。

- 将 PCR 管置于热循环仪上按以下条件进行反应，建议条件如下：

94℃	10 min	} 30-33 cycles
94℃	30 sec	
55℃	30 sec	
72℃	0.5-1 min/kb	
72℃	5 min	

▲延伸时间请根据插入片段大小进行调整。预变性时间延长到 10 min，主要是为了裂解菌落，释放 DNA 模板。

- 反应结束后，取 5-10 μL 直接上样电泳检测。

▲若细菌裂解困难或杂质多、假阴性，尝试如下方法，裂解释放 DNA 后再进行实验。

- 挑取菌落加入到 50 μL 或 10 μL ddH₂O 中，吸打混匀。
- 99℃，10 min 灭活菌液中的酶，并释放 DNA。
- 12,000 rpm (13,400×g) 离心 1 min 去除细胞碎片。
- 取上清进行 PCR，25 μL PCR 体系取 5 μL 上清（起始 50 μL ddH₂O）或 1 μL 上清（起始 10 μL ddH₂O）做模板。

06/注意事项

- ◇重组菌落鉴定时，挑取单菌落前，应先做好标记，便于鉴定后使用。
- ◇挑取菌落时，应选择单菌落，不要挑取太多菌体，以免影响 PCR 结果。
- ◇设定 PCR 程序时，请根据插入片段大小决定延伸时间，如果插入片段大小为 1 kb 以下，延伸时间 30-45 s 即可，如果片段更长，可按此比例增加延伸时间。

07/相关产品

- AJ0205 Agarose
- AJ0208 Spark GoldView
- AK0101 Spark pBLUE-T Quick Ligation Kit (with T4 Ligase)
- AK0102 Spark pBLUE-T Vector
- AK0401 Spark Zero Background pTOPO-TA Cloning Kit

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

