

新型 PCR 产物克隆自杀载体系列 (NEW!!)

pGH Blunt end PCR 产物克隆系统

GV6028 20 次

GV6029 50 次

一、系统说明

pGH Blunt end cloning Vector 一种新型高效克隆 PCR 产物的专用线性载体，用于平末端 PCR 产物的克隆。它是由 pTZ19R 载体改造成的,因此具有该载体的所有特性。用该载体转化的克隆>90%含有目的片段，无需蓝-白斑筛选，有效克服假阳性造成的困扰，大大简化转化步骤。MCS 除保留克隆位点两侧两个 HindIII 外，移除掉所有常见的限制性内切酶酶切识别序列，保证最后克隆产物客户预留位点的单一性。另外该载体还有 T/A 克隆形态（编号 GV0102A），给您更全面的选择。

试剂盒组成：

		GV6028 20 次	GV6029 50 次
内容	浓度	总量	总量
pGH Blunt end vector	20ng/uL	50ul	125ul
Control insert (500bp)	10ng/uL	20ul	20ul
T4 DNA Ligase	5u/uL	30ul	70ul
T4 DNA Ligase buffer	5×	80ul	200ul

质量控制：

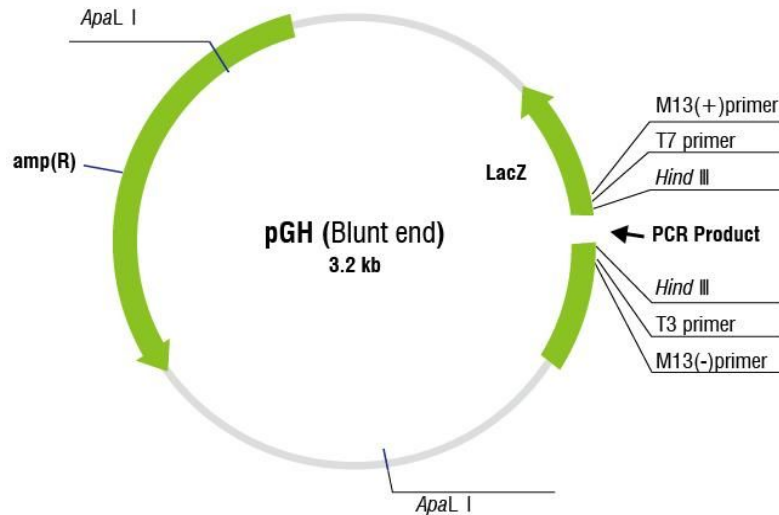
1. Control Insert 经克隆后，>99%以上为白色菌落；
2. 用 HindIII 鉴定，白色菌落中 90%以上包含正确大小的片段；

用途：

- 1.平末端 克隆 PCR 产物；
2. 对克隆的 PCR 产物用 M13+,M13-,或 T7 通用引物进行测序；

运输和保存条件： -20°C.





pGH 载体图谱

二、使用说明

PCR 产物纯化处理:

PCR 产物可以进行切胶纯化，直接沉淀或直接用于连接。

PCR 产物取一部分进行分析，对于有杂带或扩增较弥散的 PCR 产物必须进行切胶纯化。相反，如果扩增条带专一，无引物二聚体干扰的 PCR 产物，不作任何纯化处理直接用于克隆同样可以得到较好的结果。

对照实验:

强烈建议在做正式片段之前进行如下对照实验，以便于正确使用该载体。

对照包括：正对照和转化对照。

连接反应:

1、离心载体及 control insert;

2、设立反应体系:

	标准反应	正对照
pGH Blunt end cloning	2uL*	2uL
Vector (20ng/uL)		
Fresh PCR product	x uL**	--
Control Insert(500bp)	--	2uL***
5x T4 Buffer	4uL	4uL
T4 DNA Ligase	5units	5units
ddH ₂ O	up to 20uL	up to 20uL
Total	20uL	20uL



注：*：对于连接 3kb 以上的片段，建议将载体的量加倍，可以得到较好的效果。

**：载体与插入片段的分子数比需要优化：一般 vector:insert 在 1:5~3:1 之间均可得到较好的结果。

***：载体与插入片段比为 1:2。

- 3、混匀，离心，在 22℃ 连接 1 小时以上或 16℃ 连接过夜；
- 4、转化：取 10uL 或全量连接产物转化 100uL 感受态细胞；
- 5、冰浴 20 分钟；
- 6、42℃ 热激 45 秒钟后，再在冰中放置 2 分钟；
- 7、加入 500μl SOC 培养基或 LB 培养基，37℃ 振荡培养 60 分钟；
- 8、在含有 Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养，形成单菌落。计数白色菌落；

注：此步需要根据感受态细胞效率进行调整，使每个平板上长出 100 到 1000 个菌落，以便于以后的实验操作。

- 9、对于白色克隆，用酶切法或 PCR 法进行鉴定插入片段。

几种对照反应的说明：

对照反应	说 明
转化效率对照	检验感受态细胞的效率。如果转化效率低于 1×10^6 cfu/ug pTZ19R DNA，需要重新制备感受态细胞。
正对照反应	检测连接反应系统和 pGH Blunt end cloning Vector 的效率。用提供的 ontrol insert 做对照，应该 99% 以上的克隆为白色克隆，在白色克隆中，用 <i>HindIII</i> 进行酶切鉴定，90% 以上克隆应该含有插入片段。

三、常见问题分析

问题	可能原因	解决方案
转化后克隆很少或者没有克隆	感受态细胞转化效率低	检测转化效率，建议使用转化率 $>1 \times 10^8$ cfu/μg 的感受态细胞
	转化时加入了太多连接液	感受态细胞中不要加入超过 20 μl 连接产物，太多连接产物会抑制转化
	PCR 产物或者线性化载体中存在抑制剂	建议 PCR 产物或者线性化载体都经过割胶纯化
	载体与片段的摩尔比失调	一般载体/片段=2: 1，如果载体与片段大小相差不多，载体/片段=1: 1
大多数克隆没有目的片段插入	连接产物中污染了其他相同抗性的质粒	直接过柱纯化 PCR 产物可能会污染模板质粒，建议割胶纯化 PCR 产物