

pGH PCR 产物 T/A 克隆试剂盒

GV6028A 20 次

GV6029A 50 次

一、产品组成

Components	GV6028A	GV6029A
pGH T/A cloning 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

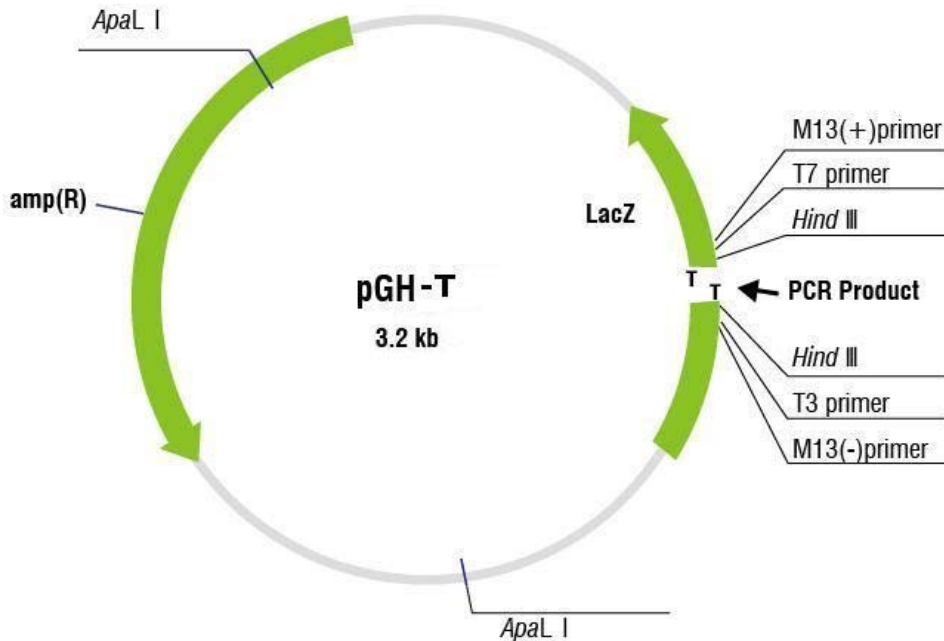
二、产品说明

pGH T/A cloning Vector 一种新型高效克隆 PCR 产物的专用线性载体，用于 3'端突出的 A 的 PCR 产物的 T/A 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。另外该载体还有平末端克隆形态（编号 GV0102），给您更全面的选择。

pGH T/A cloning Vector 多克隆位点结构:

```

Hind III          EcoRV          Hind III
GGC CGT CAA GGC CAA GCT ICC CT  GG GAT ATC ACG TGA AGC TTG CAA GCT CCA GCT TTT GTT
CCG GCA GTT CCG GTT CGA AGG G    TCC CTA TAG TGC ACT TCG AAC GTT CGA GGT CGA AAA CAA
          ↑
          PCR Product
  
```



pGH T/A cloning Vector 载体图谱

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. PCR 产物 T/A 克隆;
2. 对克隆的 PCR 产物用 M13+, M13-, 或 T7 通用引物进行测序。

三、操作说明

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(切胶纯化有时会损伤 3'端突出的 A, 降低连接效率)。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。

平端 PCR 产物纯化处理:

本载体系统是建立在 T/A 克隆基础之上的。由于一些 pfu 聚合酶扩增出的 PCR 产物是平末端, 因此在进行连接之前必须进行加 A 处理。具体措施是将纯化好的 PCR 产物加入 Taq 酶扩增体系, 在 72℃ 保温 10-30 分钟, 即将平端的 PCR 产物加上 A。加 A 处理好的 PCR 产物即可进行正常的连接反应。

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 T/A cloning Vector (20ng/uL)	2uL*	2uL
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 T/A cloning Vector 的效率。用提供的 control insert 做对照, 应该 99% 以上的克隆为白色克隆, 在白色克隆中, 用 HindIII 进行酶切鉴定, 90% 以上克隆应该含有插入片段。

四、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/ μ g 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 μ l 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大, 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

五、运输及保存: -20°C 。

Product Use Limitation:

This product is developed, designed and sold exclusively for research purpose and in vitro use only.

