

pGE PCR产物 T/A 克隆试剂盒

GV6030A 20 次

GV6031A 50 次

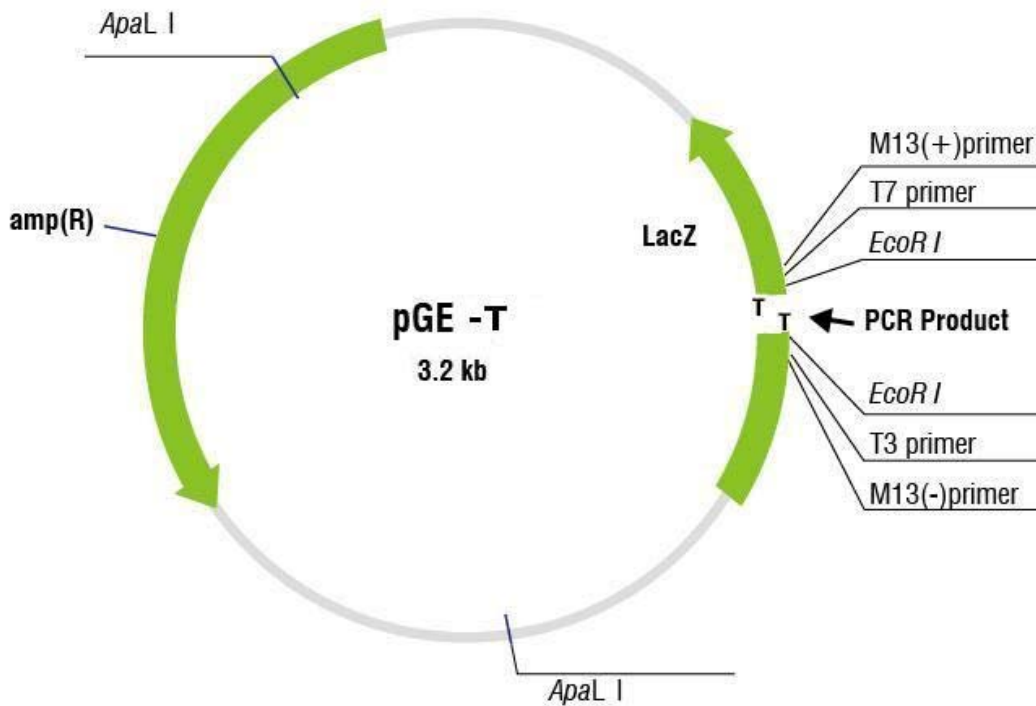
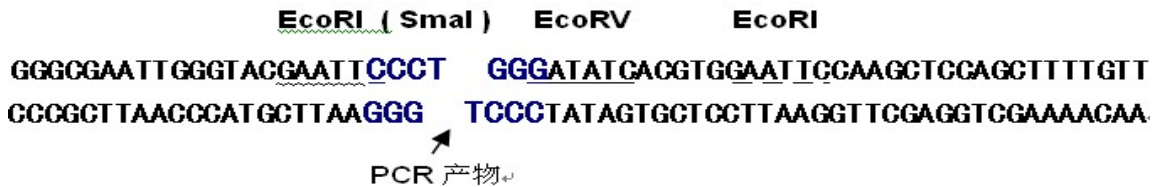
一、产品组成

Components	GV6030A	GV6031A
pGE 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

pGE 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 EcoRI 外，移除掉所有常见的限制性内切酶识别序列，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 GV0103），给您更全面的选择。

pGE T/A cloning Vector 多克隆位点结构：



pGE 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 EcoRI 鉴定, 白色菌落中 90%以上包含正确大小的片段。

用途:

1. 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。

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, 即可以将平端的 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
pGE 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 pGE 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 <i>EcoRI</i> 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.

