

## pTG dual-T PCR 产物克隆载体

Cat#. GV0110-A 1.2ug  
 Cat#. GV0110-B Ax5  
 Cat#. GV0110-C Ax10

### 一、系统说明

1. pTG dual-T vector 以 pCR4 载体为基础改造而成，同时具有 Amp/Kan 两种常用的抗性基因，可以用其中的一种抗性或两种抗性同时进行筛选。
2. 该载体不需要用蓝白斑进行筛选，连接产物直接进行转化涂板即可。
3. 该载体插入位点两端各有一个 *EcoRI* 酶切位点，可以优先用 *EcoRI* 对插入的目的片段进行酶切鉴定。
4. 由于含致死基因筛选，可能个别片段会难克隆或无法筛选到正确片段（尤其对于克隆小片段，遇到多克隆位点的 ORF 读通的可能性比较大），如果遇到该情况，请换用 pTG19-T(Cat # GV0101)常规 TA 克隆载体。

### 产品组成:

#### GV0110-A 1.2ug

内容	浓度	总量
pTG dual-T vector	25ng/uL	50ul
Control insert (500bp)	12.5ng/uL	20ul

### 质量控制:

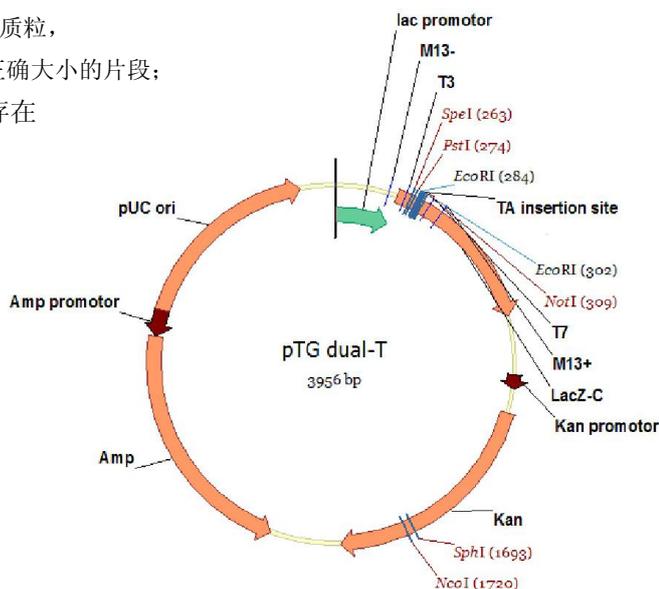
1. Control Insert 经克隆后，挑取单菌落培养提质粒，然后用 *EcoRI* 鉴定，菌落中 90% 以上包含正确大小的片段；
2. 用测序方法确认多克隆位点和 T 碱基的存在

### 用途:

1. TA 克隆 PCR 产物；
2. 对克隆的 PCR 产物用 M13+, M13-, 或 T7, T3 通用引物进行测序；

### 运输和保存:

-20℃



### pTG dual-T 载体图谱和多克隆位点结构:

#### pTG dual-T 载体多克隆位点序列

```

    SpeI      PstI      DraI      EcoRI      EcoRI      NotI
    AAAGGGACTA GTCCTGCAGG TTTAAACGAA TTCCAAGAT T ATCTTGGAA TTCGCGGCCG CTAA
    TTTCCCTGAT CAGGACGTCC AAATTTGCTT AAGGTICTA A PCR product T TAGAACCTT AAGCGCCGGC GAT
  
```

pTG dual-T 载体结构图

## 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 产物取一部分进行电泳分析, 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。可以选用 GK6011/GK6012 平末端 PCR 产物添 A 试剂盒进行加 A 处理。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。本试剂盒额外提供了一些载体及相关试剂, 足以进行额外的 3~5 次对照实验。

对照包括: 正对照、负对照(自连对照)、转化对照

### 连接反应:

- 1、离心载体及 Control insert;
- 2、设立反应体系:

	<u>标准反应</u>	<u>正对照</u>	<u>负对照(自连对照)</u>
pTG dual-T vector (25ng/uL)	2uL*	2uL	2uL
Fresh PCR product	x uL**	--	--
Control Insert(500bp)	--	1uL***	--
5x T4 Buffer	2uL	2uL	2uL
T4 DNA Ligase	5units	5units	5units
ddH <sub>2</sub> O	up to 10uL	up to 10uL	up to 10uL
Total	10uL	10uL	10uL

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

5xT4 Buffer 和 T4 DNA Ligase 需用户自备。

- 3、混匀, 离心, 在 22℃ 连接 1 小时或 4℃ 连接过夜;

注: 为了最大限度提高连接效率, 大于 2kb 的 PCR 产物, 4℃ 连接过夜是有必要的。

- 4、转化: 取 5uL 或全量连接产物转化 100uL 感受态细胞;
- 5、冰浴 20~30 分钟;
- 6、42℃ 热激 45~90 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 30~60 分钟;

- 8、在含有 Amp (或 Kan) 的琼脂平板培养基上培养, 形成单菌落。计数菌落数;

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。

Kan 抗性的琼脂平板也可以使用, 但是所长菌斑数会比 Amp 抗性的琼脂平板少 1~2 倍。

- 9、对于白色克隆, 提取质粒用酶切法进行鉴定或用 T vector 重组菌落 PCR 鉴定试剂盒直接进行菌斑鉴定。

### 几种对照反应的说明:

对照反应	说明
自连对照	自连对照检测载体是否丢失了3'突出的T碱基。丢失了一个T碱基的载体发生自连的话,由于破坏了lacZ基因的读码框,导致错误的白色克隆产生。如果两个突出的T碱基均丢失,平端自连由于致死基因效应,菌斑很少。未发生T丢失的载体,由于不能自连环化,转化后菌斑也很少。每批载体做质量检测时,用5倍量的载体做自连对照。
转化效率对照	检验感受态细胞的效率。如果转化效率低于 $1 \times 10^6$ 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 pTG dual-T 载体的效率。用提供的 control insert 做对照,挑选菌斑培养,提取质粒,用 EcoRI 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

现象	可能原因	解决方案
转化后无菌落生长	细胞已经失去感受态	用 pTZ19R 质粒进行转化,确认感受态细胞的转化效率。1ng pTZ19R 质粒至少应得到 1000 个以上的转化子。如有问题,重新制备感受态细胞。
	平板所用抗性不对 平板时间太长失水	pTG dual-T 载体为 amp/Kan 双抗性,用 100 ug/ml 浓度的 amp 抗性或 25ug/ml Kan 抗性。用新制备的 amp 或 Kan 抗性平板
	连接中试用了不恰当的 vector:insert 比例	估计一下 PCR 产物的量及片段大小,将 vector:insert 比例限制在 3:1 到 1:5 的范围内。对于极小的 PCR 产物,有可能因为 PCR 产物严重过量,导致无菌落或菌落极少。
	片段较小,ORF 读通	很小的插入片段 (<200bp) 不一定完全将 lacZ 基因失活,由于载体自身具有致死性,如果没有外源片段插入失活致死基因,则转化菌不能生成菌落。
白色克隆无插入片段	可能载体单个的3'端突出的T已经部分降解。	试用其他批次的 T 载体,避免反复冻融载体,尽量将载体在 6 个月内用完,做自连对照检测 T 载体。
在含有 IPTG/X-gal 的平板上有淡蓝色菌斑	本载体不需要用 IPTG/X-gal 进行蓝白斑筛选,如果在含有 IPTG/X-gal 的平板上有淡蓝色菌斑,可能是所用 IPTG/X-gal 浓度较高,时间较长后会有淡蓝色菌斑生成。	对实验没有什么影响,直接挑菌落提质粒进行后续实验即可。如果菌落数很少,则需要相关实验检测原因。
所挑菌落在液体培养基中不长	可能菌落为 amp 敏感的卫星菌落	确认挑选大的白色菌落,确认 amp 有效。另外如果使用 Amp/Kan 双抗性培养基时,将两种抗生素浓度减半,并适当延长培养时间。