

pGH-T simple PCR 产物 TA 克隆试剂盒

Cat# GV6037 20 次

Cat# GV6038 50 次

Cat# GV0109 1.2ug(只含载体)

一、系统说明

1. 高效克隆 PCR 产物的专用线性载体系列。它是由 pBluescriptII SK(+)载体改造成的,因此具有该载体的所有特性。新型 PCR 产物克隆载体, 引入致死基因, 大大降低载体自连效率, 转化克隆>90%含有目的片段, 阳性克隆率高。
2. MCS 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。需要用 PCR 法对插入片段进行鉴定, 可以优先选择 GK6041/GK6042 重组菌落 PCR 鉴定试剂盒。
3. 该载体含有致死基因, 可进行插入失活筛选, 不需要进行蓝白斑筛选, 阳性克隆率高。
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:

内容	GV6037 20 次		GV6038 100 次		GV0109(1.2ug)	
	浓度	总量	浓度	总量	浓度	总量
pGH-T simple vector	25ng/ul	50ul	25ng/ul	5x50ul	25ng/ul	50ul
Control insert (700bp)	12.5ng/ul	20ul	12.5ng/ul	20ul	12.5ng/ul	20ul
2xquick ligation solution	2x	2x75ul	2x	10x75ul	--	--

注: GV6038 为 5 个 GV6037 的独立包装

质量控制:

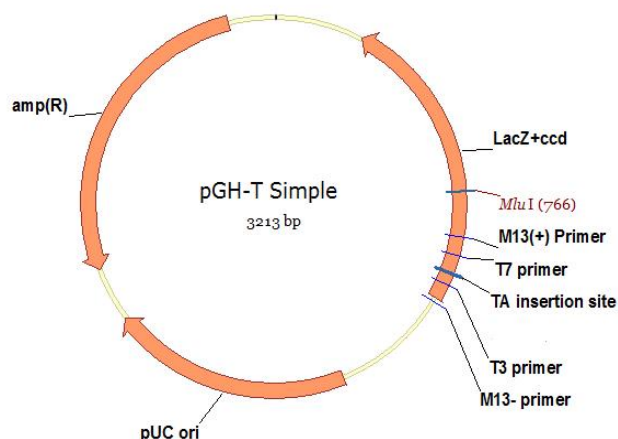
1. Control Insert 经克隆后, 挑取单菌落培养提质粒, 然后用 PCR 法鉴定, 白色菌落中 90%以上包含正确大小的片段;
2. 用测序方法确认多克隆位点和 T 碱基的存在

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℃



pGH-T simple 载体结构图

pGH-T simple 载体图谱和多克隆位点结构:

pGH-T simple 载体多克隆位点序列

AATTGGGTAC GGCCGTC AAG CTCTCCAAGA T T PCR product A ATC TTGGAAGCC TGCAAGCTCC AGCTT
 TTAACCCATG CCGGCAGTTC GAGAGGTTCT A A TAG AACCTTTCGG ACGTTCGAGG TCGAA

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，足以进行除了 20 次试验外的 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:

	标准反应	正对照	负对照(自连对照)
pGH-T simple vector (25ng/uL)	2uL *	2uL	2uL
Fresh PCR product	x uL**	--	--
Control Insert(700bp)	--	2uL ***	--
2xquick ligation solution	5uL	5uL	5uL
ddH ₂ 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

- 3、混匀，离心，在 22℃ 连接 10~30 分钟；

注：对于 3kb~5kb 的片段，延长连接时间至 1~2 小时，可以最大限度提高连接效率。

- 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 60 分钟；
- 8、在含有 Amp 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。

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 1×10^6 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 simple 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 <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

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	pGH-T simple 载体为 amp 抗性,用 100 ug/ml 浓度的 amp 抗性 用新制备的 amp 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 (<500bp) 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,则转化菌不能生长成菌落。
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,可能是所有 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,则需要进行相关实验检测原因。
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。

