

Code No. 6013

研究用

TaKaRa

pMD™19-T Vector
Cloning Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 纯 度	1
● 用 途	1
● pMD19-T Vector 的结构	1
● 实验操作	2
■ Control DNA 片段的克隆实验	2
■ 一般 DNA 片段的克隆实验	2
■ 一种可供选择的快速克隆法	3
● 相关说明	4
● 使用注意	4
● Q&A	5

● 制品说明

pMD19-T Vector 是一种高效克隆 PCR 产物 (TA Cloning) 的专用载体。本载体由 pUC19 载体改建而成，在 pUC19 载体的多克隆位点处的 *Xba* I 和 *Sal* I 识别位点之间插入了 *EcoR* V 识别位点，用 *EcoR* V 进行酶切反应后，再在两侧的 3' 端添加“T”而成。因大部分耐热性 DNA 聚合酶进行 PCR 反应时都有在 PCR 产物的 3' 末端添加一个“A”的特性，所以使用本制品可以大大提高 PCR 产物的连接、克隆效率。

由于本载体以 pUC19 载体为基础构建而成，所以它具有同 pUC19 载体相同的功能。此外，本制品中的高效连接液 Solution I 可以在短时间内 (约 30 分钟) 完成连接反应，其连接液可以直接用于细菌转化，大大方便了实验操作。本制品中的 Control Insert (500 bp) 还可以用于 Control 反应。

本载体与 pMD18-T Vector 相比，本制品的 β -半乳糖苷酶的表达活性更高，菌落显示蓝色的时间缩短，菌落显示的蓝色更深。因此，克隆后更容易进行克隆体的蓝白筛选。

● 制品内容 (20 次量)

pMD19-T Vector (50 ng/ μ l)	20 μ l \times 1 支
Control Insert (50 ng/ μ l)	10 μ l \times 1 支
Solution I*	75 μ l \times 2 支

* 使用时请于冰中融解。

● 保 存: -20℃

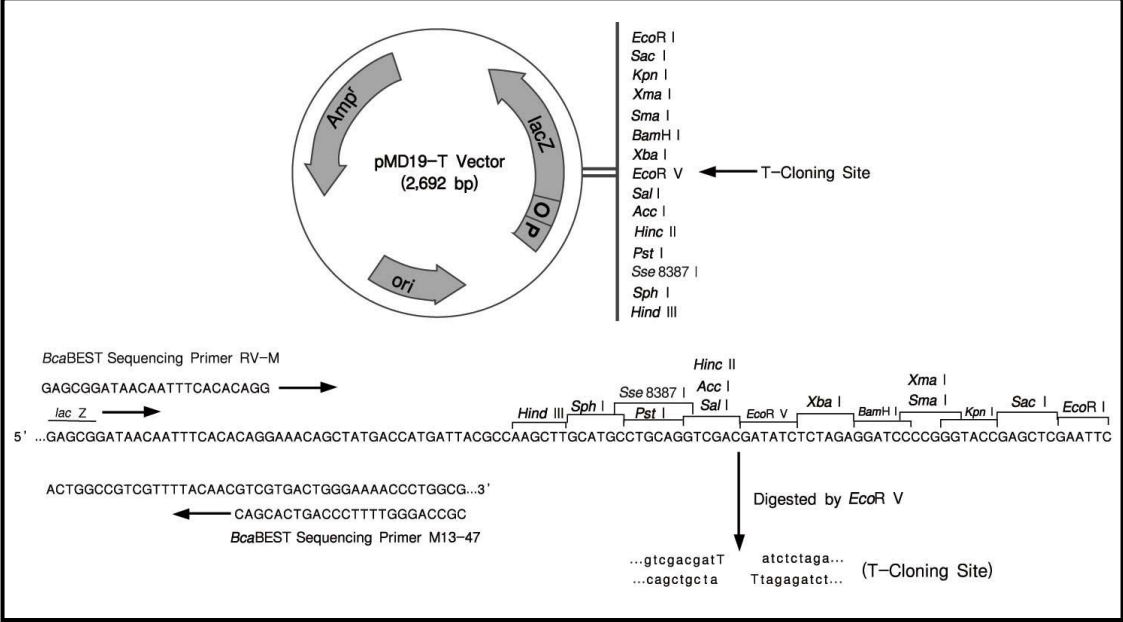
● 纯 度

- Control Insert 经克隆后的白色菌落中，有 90%以上含有 Insert DNA 片段。

● 用 途

- 进行 TA 克隆，克隆 PCR 产物。
- 对克隆后的 PCR 产物使用 *Bca*BEST Sequencing Primers、M13 Primers 进行 DNA 测序。

● pMD19-T Vector 的结构



【pMD19-T Vector 相关位点说明】

Cloning site	431
BcaBEST Sequencing Primer M13-47 binding site	352-375
BcaBEST Sequencing Primer RV-M binding site	484-507
LacZ operator	146-475
ColE1 ori	873-1461
Amp ^r	1632-2492

● 实验操作

■ Control DNA 片段的克隆实验

A) 操作方法

- 1) 在微量离心管中配制下列 DNA 溶液，全量为 5 μ l。

试剂	使用量
pMD19-T Vector ^{*1}	1 μ l
Control Insert ^{*2}	1 μ l
dH ₂ O	3 μ l

- 2) 加入 5 μ l (等量) 的 Solution I。

- 3) 16°C反应 30 分钟。

注) ① 室温 (25°C) 也能正常进行连接反应，但反应效率稍微降低。

② 5 分钟也能正常进行连接反应，但反应效率稍微降低。

- 4) 全量 (10 μ l) 加入至 100 μ l JM109 感受态细胞中，冰中放置 30 分钟。
- 5) 42°C加热 45 秒钟后，再在冰中放置 1 分钟。
- 6) 加入 890 μ l SOC 培养基，37°C振荡培养 60 分钟。
- 7) 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养，形成单菌落。计数白色、蓝色菌落。
- 8) 挑选白色菌落，使用 PCR 法确认载体中插入片段的长度大小。

B) 结果

使用 Control Insert 时的连接/转化结果如下，使用的感受态细胞的转化效率为： 1.5×10^8 cfu/ μ g pUC19 DNA。

Control Insert	连接/转化效率 (cfu/ μ g Vector)	白色菌落比率 (%)	效率 (%) *
+	2.8×10^6	96.3	90 以上
-	2.2×10^5	40.2	0

* 效率是指白色菌落中的目的 DNA Insert 片段的连入效率。

■ 一般 DNA 片段的克隆实验

- 1) 在微量离心管中配制下列 DNA 溶液，全量为 5 μ l。

试剂	使用量
pMD19-T Vector ^{*1}	1 μ l
Insert DNA ^{*3}	0.1 pmol~0.3 pmol
dH ₂ O	up to 5 μ l

- 2) 加入 5 μl (等量) 的 Solution I。
 - 3) 16°C反应 30 分钟。
- 注) ① 室温 (25°C) 也能正常进行连接反应, 但反应效率稍微降低。
 ② 5 分钟也能正常进行连接反应, 但反应效率稍微降低。
 ③ 长片段 PCR 产物 (2 kb 以上) 进行 DNA 克隆时, 连接反应时间请延长至数小时。
- 4) 全量 (10 μl) 加入至 100 μl JM109 感受态细胞中, 冰中放置 30 分钟。
 - 5) 42°C加热 45 秒钟后, 再在冰中放置 1 分钟。
 - 6) 加入 890 μl SOC 培养基, 37°C振荡培养 60 分钟。
 - 7) 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养, 形成单菌落。计数白色、蓝色菌落。
 - 8) 挑选白色菌落, 使用 PCR 法确认载体中插入片段的长度大小。

■ 一种可供选择的快速克隆法*4

- 1) 在微量离心管中配制下列 DNA 溶液, 全量为 5 μl 。

试剂	使用量
pMD19-T Vector*1	1 μl
Insert DNA*3	0.1 pmol~0.3 pmol
dH ₂ O	up to 5 μl

- 2) 加入 5 μl (等量) 的 Solution I。
 - 3) 16°C反应 30 分钟。
- 注) ① 室温 (25°C) 也能正常进行连接反应, 但反应效率稍微降低。
 ② 5 分钟也能正常进行连接反应, 但反应效率稍微降低。
 ③ 长片段 PCR 产物 (2 kb 以上) 进行 DNA 克隆时, 连接反应时间请延长至数小时。
- 4) 取 2 μl 上述连接液 (10 ng Vector DNA) 加入到 microcentrifuge tubes 中, 冰上冷却 2 min。
 - 5) 取 50 μl *E.coli* JM109 Competent Cell 加入到上述 microcentrifuge tubes 中, 混匀并冰浴 5 min。
 - 6) 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养 (平板使用前需要在 37°C预热 30 分钟), 形成单菌落。计数白色、蓝色菌落。

*1 pMD19-T Vector 的使用量

取 0.5 μl 实验也可得到满意的结果。实际操作时, 可按实验需要确定 T 载体的使用量。pMD19-T Vector 1 μl (50 ng) 的摩尔数约为 0.03 pmol。

*2 Control Insert

Control Insert 为 500 bp 的 3' 末端带有 A 碱基的 PCR 产物, Control Insert 1 μl (50 ng) 的摩尔数约为 0.15 pmol。

*3 Insert DNA 的使用量

在进行克隆时, Vector DNA 和 Insert DNA 的摩尔比一般为: 1: 2~10。

*4 快速克隆法

该克隆方法的效率会有所下降, 但此方法操作简单、迅速, 是一快速克隆 DNA 片段的方法, 可以满足一定客户的需求。

● 相关说明

1. 感受态细胞的选择。

转化时请使用高效的热转化感受态细胞（转化效率 $\geq 1 \times 10^8$ cfu/ μ g pUC19），这样才可能得到比较理想的阳性克隆。如果需要蓝白筛选时，宿主细胞必须具有正确的基因型（F' 编码的 [*LacZ* Δ M15]）产生 ω Fragment，才可能和载体 DNA 产生的 *LacZ* α 多肽相结合，表现出 β -半乳糖苷酶活性（ α -互补性）。

2. Insert DNA 的要求。

Insert DNA 应该进行切胶回收的纯化处理后才进行载体连接，尽量避免引物等其它杂质的存在。切胶回收时可使用 Takara 凝胶回收试剂盒（Code No. 9762）。

3. Insert DNA 使用量的计算方法。

进行克隆时，Vector DNA 和 Insert DNA 的摩尔数比一般为 1: 2~10，我们可以根据自己的实验情况选择合适的 Vector DNA 和 Insert DNA 的摩尔数比。Insert DNA 使用量的计算方法如下：

Insert DNA 的使用量 (ng) = nmol 数 \times 660 \times Insert DNA 的 bp 数

本载体 1 μ l (50 ng) 的摩尔数约为 0.03 pmol。

4. 阳性克隆的检测。

DNA 片段成功插入至 pMD19-T Vector 中后，一般情况下 β -半乳糖苷酶的表达将受到破坏，重组克隆体在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养时将显示白色菌落。但有时比较短的 DNA 片段插入载体时，基因的读码框有可能正好与 *LacZ* 的读码框相吻合，克隆体也会显示蓝色菌落。有报道称，2 kb 的 DNA 片段插入到载体中后，重组克隆体仍显示了蓝色。所以，当我们没有得到白色菌落时，可以试着检测蓝色菌落。进行阳性克隆检测时，我们建议使用 PCR 的方法，扩增用引物可以使用 *BcaBEST Sequencing Primers*，可以对菌体直接进行 PCR 扩增。

5. 阳性对照实验。

为了确认实验操作的正确性以及实验试剂的有效性，我们建议进行阳性对照实验。按照实验操作方法，使用试剂盒中提供的 Control Insert，可以进行 10 次阳性对照实验。

6. 转化效率的计算。

取 0.1 ng 的 pUC19 Plasmid DNA 加入至 100 μ l 的热转化感受态细胞中后，再加入 900 μ l 的 SOC 培养基 (0.1 ng DNA/ml)，将上述培养液稀释 10 倍后 (0.01 ng DNA/ml) 取 100 μ l 涂布平板 (0.001 ng DNA/100 μ l)，记录菌落数。以得到 200 个克隆体为例计算转化效率，此时的转化效率 = 200 cfu/0.001 ng = 2×10^5 cfu/ng = 2×10^8 cfu/ μ g pUC19 DNA。

● 使用注意

1. Solution I 请于冰中融解。

2. 克隆时使用的 Insert DNA 片段 (PCR 产物) 建议进行切胶回收纯化，否则 PCR 产物中的短片段 DNA (甚至是电泳也无法确认的非特异性小片段)、残存引物等杂质都会影响 TA 克隆效率。

3. 按照本实验操作进行连接后，直接进行转化时的连接液不要超过 20 μ l。当要转化的 DNA 量较大或准备进行电转化时，需对连接液进行乙醇沉淀，纯化 DNA 后再进行转化。进行乙醇沉淀时使用 Dr. GenTLE Precipitation Carrier (Code No. 9094) 可以提高 DNA 的回收率。

4. 连接反应请在 25℃ 以下进行，温度升高 (>26℃) 较难形成环状 DNA。连接效率偏低时，可适当延长连接反应时间至数小时。

5. 本制品来源于 pUC19 载体，因此，适合 pUC19 载体的感受态细胞都可以使用，如：JM109 等。

● Q&A

Q-1 怎样提高连接转化效率?

- A-1
1. 确认 Insert DNA 片段的 3' 末端是否带有“A”尾。大部分的高保真 DNA 聚合酶(如: Takara *Pyrobest*、KOD、*Pfx*、*Pfu* 等)扩增的 PCR 产物是平滑末端, 不能直接进行 TA 克隆。
 2. 纯化 PCR 产物。最好使用切胶回收的 PCR 片段, 以除去 PCR 产物中的非特异性片段和引物等杂质。进行切胶回收时可以使用 Takara 凝胶回收试剂盒 (Code No. 9762)。
 3. 请使用转化效率大于 10^8 cfu/ μ g pUC19 DNA 的感受态细胞。
 4. DNA 片段的立体结构、DNA 片段的长短都会影响克隆效率。一般情况下, 大片段 DNA 的克隆效率(连接效率与转化效率)偏低, 此时可以延长连接反应时间, 或采用电转化方法。
 5. 进行切胶回收纯化 DNA 片段时, 不要使 DNA 片段在紫外线下暴露时间过长。
 6. Solution I 应尽量避免反复冻融。
 7. 建议使用新配制的平板培养基。

Q-2 转化后的菌落全为蓝色, 但有目的 DNA 片段的插入, 为什么?

A-2 插入的 DNA 片段较短(小于 500 bp), 且插入片段没有影响 *LacZ* 基因的读框, 此时平板培养基上出现的菌落有可能呈现蓝色(或淡蓝色)。

Q-3 欲对克隆 DNA 片段进行测序时, 使用何种引物?

A-3 本载体来源于 pUC19 载体。因此, 用于 pUC19 载体测序的通用引物都可以使用。

Q-4 pMD19-T Vector 与 pMD18-T Vector 相比有何不同?

A-4 pMD19-T Vector 与 pMD18-T Vector 相比, β -半乳糖苷酶的表达活性更高, 菌落显示蓝色的时间缩短, 菌落显示的蓝色更深。pMD18-T Vector 连接转化后, 一般要经 37°C 过夜培养, 然后再将其于冰箱内放置一段时间后, 其蓝白菌落才能明显呈色。而 pMD19-T Vector 涂板培养后一般只需 10 个小时(37°C)便可以呈色。因此, pMD19-T Vector 比 pMD18-T Vector 更适合于蓝白菌落的筛选。

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TAKARA BIO INC.

If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 543 7247 or from our website at www.takara-bio.com.

Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements.

All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>

v201412Da