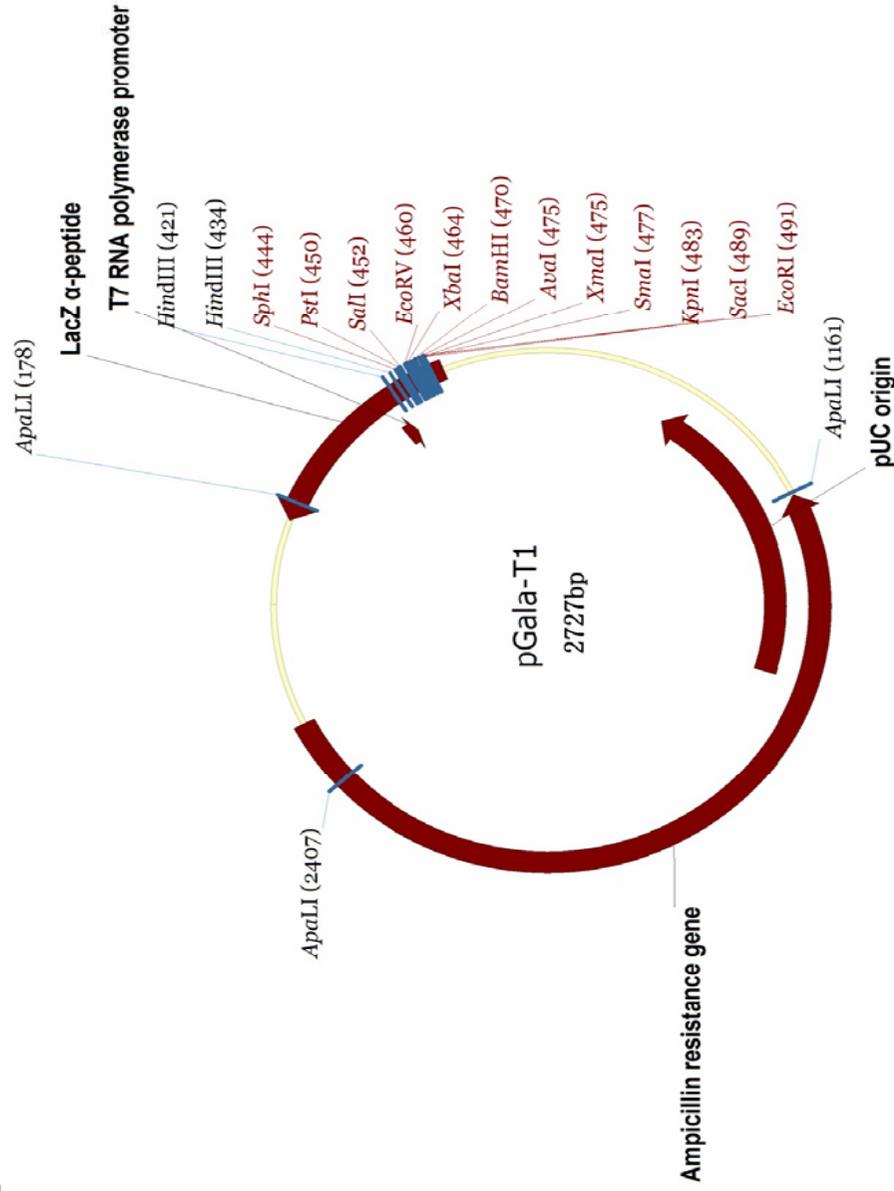


pGala-T Vector 结构图

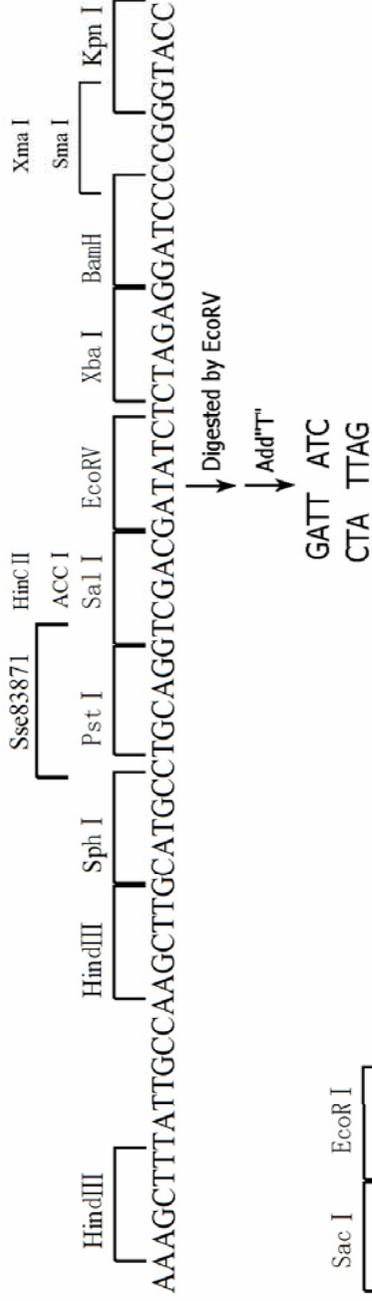


BcaBEST Sequencing Primer M13-47 binding site →

CGCCAGGGTTTTCCCGAGTCACGAC →

CGCCAGGGTTTTCCCGAGTCACGACGTTGTAAACACGACGGCCAGTGTAATACGACTCACTATAGGGCG

T7 RNA polymerase promoter →



*Sac*I *EcoR*I

GAGCTCGAATTCGTAATCATGGTCAATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC

← *lacZ*

← GGACACACTTTAACAAATAGCGGAG

BcaBEST Sequencing Primer RV-M binding site

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。

pGala-T Vector*1	1 μ l
Control Insert*2	1 μ l
dH2O	3 μ l

2) 加入5 μ l (等量) 的 Solution I。

3) 16 $^{\circ}$ C反应30分钟。

注：① 室温 (25 $^{\circ}$ 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或其他感受态细胞中，冰中放置30分钟。

5) 42 $^{\circ}$ C加热45秒钟后，再在冰中放置1分钟。

6) 加入890 μ l SOC或LB培养基，37 $^{\circ}$ 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 UC19 DNA。

Control Insert	连接/转化效率 (cfu/ μ g Vector)	白色菌落比率 (%)	效率 (%) *
+	1.7×10^6	98.1	90以上
-	1.1×10^5	40.4	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

pGala-T Vector*1	1 μ l
Insert DNA*3	0.1 pmol~0.3 pmol
dH2O up to	5 μ l

2) 加入5 μ l (等量) 的 Solution I。

3) 16 $^{\circ}$ C反应30分钟。

注) ① 室温 (25 $^{\circ}$ 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 kbp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 μ l) 加入至100 μ l JM109或其他感受态细胞中，冰中放置30分钟。

5) 42 $^{\circ}$ C加热90秒钟后，再在冰中放置1分钟。

6) 加入890 μ l SOC培养基，37 $^{\circ}$ 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。

*1 pGala-T Vector的使用量

取0.5 μ l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。pGala-T Vector 1 μ l (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 μ l (50 ng) 的摩尔数约为0.15pmol。

*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。

●产品说明

pGala-T Vector 是一种高效克隆 PCR 产物 (TA Cloning) 的专用载体。本载体由 pUC18 载体改建而成, 在 pUC18 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' 末端添加“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, 所以使用本产品可以大大提高 PCR 产物的连接、克隆效率。由于本载体以 pUC18 载体为基础构建而成, 所以它具有同 pUC18 载体相同的功能。此外, 本产品中的高效连接液 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。本产品中的 Control Insert (500 bp) 还可以用于 Control 反应。

●连结效率

■ 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 BcaBESTM Sequencing Primers、M13 Primers 进行 DNA 测序。

【pGala-T Vector相关位点说明】

Cloning site	459
BcaBEST Sequencing Primer M13-47 binding site	352-375
BcaBEST Sequencing Primer RV-M binding site	484-542
LacZ operator	146-510
ColE1 ori	908-1496
Amp Resistance	1632-2492

●使用注意

1. Solution I 请于冰水中融解。
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 galaxybio 核酸共沉剂可以提高 DNA 的回收率。
4. 连接反应请在 25 $^{\circ}$ C 以下进行, 温度升高 (>26 $^{\circ}$ C) 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. 本产品来源于 pUC18 载体, 因此, 适合 pUC18 载体的感受态细胞都可以使用, 如: JM109 等。

●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。如果需要进行蓝白筛选时, 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, 尽量避免引物等其他杂质的存在。切胶回时可使用 galaxybio 凝胶回收试剂盒。

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:

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

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 pMD-18 Vector 中后, 一般情况下 β -半乳糖苷酶的表达将受



pGala-T Vector

--- TA Cloning 专用载体

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 kbp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。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。

●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：KOD、LAPower、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 galaxybio 凝胶回收试剂盒。

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 pUC18 载体。因此，用于 pUC18 载体测序的通用引物都可以使用。

Cat: FV010	产品内容	浓度	规格
Cat: FV011	pGala-T Vector	50ng/ μ l	20 μ l \times 1
Cat: FV012	Control Insert	50ng/ μ l	10 μ l \times 1
Cat: FV013	Solution I		75 μ l \times 2

贮存条件：-20 保存

产品特点：

Ø pGala-T 载体是在 pUC18 载体的基础上改造而成，除多克隆位点外，其余序列同 pUC18

Ø 少量自连的载体产生的克隆会由于编码了 LacZ 基因，在 IPTG/X-Gal 平板上呈现蓝色克隆。大部分重组的载体，由于插入片断破坏了 LacZ 基因，因而在 IPTG/X-Gal 平板上呈现白色克隆。这样就可以通过蓝白斑非常容易地筛选出重组克隆。

Ø 构建完成的质粒可以通过质粒上的正反两个 M13 引物位点进行测序或通过 T7 promoter 上的 T7 引物位点进行测序。

Ø 构建完成的质粒可以利用 T7 RNA polymerase promoter 进行体外转录，用于探针标记等。