

版本号: VT150416

pGM-T克隆试剂盒

本系列产品内容

目录号	产品名称	包装
VT202-01	pGM-T连接试剂盒	20 μ l
VT202-02	(pGM-T Ligation Kit)	60 μ l
VT302-01	pGM-T克隆试剂盒	20 μ l
VT302-02	(pGM-T Cloning Kit with Competent Cell)	60 μ l
VT402	pGM-T平末端连接试剂盒 (pGM-T Vector Cloning Kit for Blunt DNA with Competent Cell)	20 μ l

产品组成	pGM-T连接试剂盒		pGM-T克隆试剂盒		pGM-T平末端 连接试剂盒
	VT202-01	VT202-02	VT302-01	VT302-02	VT402
pGM-T Vector (50 ng/ μ l)	20 μ l	60 μ l	20 μ l	60 μ l	20 μ l
T4 DNA Ligase (3 U/ μ l)	20 μ l	3 \times 20 μ l	20 μ l	3 \times 20 μ l	20 μ l
10 \times T4 DNA Ligation Buffer	30 μ l	3 \times 30 μ l	30 μ l	3 \times 30 μ l	30 μ l
2 \times T4 DNA Rapid Ligation Buffer	100 μ l	3 \times 100 μ l	100 μ l	3 \times 100 μ l	100 μ l
Control Insert DNA (700 bp) (50 ng/ μ l)	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l
TOP10 (100 μ l each)	-	-	10 \times 100 μ l	30 \times 100 μ l	10 \times 100 μ l
Compcell Control Plasmid pUC19 (0.1 ng/ μ l)	-	-	10 μ l	10 μ l	10 μ l
ddH ₂ O	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
DNA产物纯化试剂盒	-	-	-	-	20 preps
Taq DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)	-	-	-	-	50 μ l
Tailing-A Reaction Buffer (5 \times)	-	-	-	-	200 μ l

保存条件

感受态细胞需要严格的在-70℃冻存，DNA产物纯化试剂盒室温保存。其余的试剂于-20℃保存，避免反复冻融（载体和连接试剂可以适当的分装成小份，防止反复冻融，以保证质量）。

TOP10基因型

F^- , *mcrA* Δ (*mrr-hsd* RMS-*mcr* BC) ϕ 80,*lacZ* Δ M15, Δ *lac* X74,*recA1**ara* Δ 139 Δ (*ara-leu*) 7697,*galUgalK*,*rps*,L (Str^r) *endA1*,*nupG*

产品简介

pGM-T是一种高效克隆PCR产物的专用载体，它是由一种克隆载体在EcoRV酶切位点处切开，在两侧的3'端添加T而成。由于大部分耐热聚合酶反应时都会在PCR产物的3'端添加一个A，可与pGM-T 3'端的T互补连接，因此可大大提高PCR产物的连接和克隆效率。

连接使用的PCR片段3'端应带有A末端，如果是使用pfu等高保真聚合酶扩增的不带A末端的片段，应使用平末端连接试剂盒先加A末端后再连接。

试剂盒中按不同需要分别配备了高效率的连接试剂、对照用超螺旋质粒和TOP10感受态细胞等，可以方便的连接和转化。带有插入片段的重组子可根据 α 互补原理，进行蓝白斑筛选，判断载体中是否有外源基因的插入（白色克隆为阳性重组克隆，蓝色的为载体自连的克隆，具体筛选原理参考分子克隆等书籍）。克隆后，可使用通用引物T7、SP6进行测序。

使用方法（以下的步骤请在无菌条件下操作）

1. 平末端连接从此步骤开始，如片段3'末端带有A，则跳过步骤1、2，直接从步骤3开始。

使用高保真聚合酶扩增的平末端产物应先使用DNA产物纯化试剂盒进行纯化（如果PCR产物中有其它大小的杂片段，则应使用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收）。

2. 向纯化后的平末端DNA片段3'末端加A，具体的反应体系参见下表。

组成成分	体积
平末端DNA片段	15 μ l
Tailing-A Reaction Buffer (5 \times)	4 μ l
Taq DNA Polymerase	1 μ l

反应条件：72 $^{\circ}$ C 保温20-30 min。加A后的产物可以直接用于下面的连接反应。

3. 将载体在冰上融化（尽可能避免反复冻融载体，在初次使用时最好分装成小份，每次使用时取出一份），短暂离心装有载体的离心管，以免液体挂在管壁上。
4. 按照下表的内容在无菌的离心管中加入各种成分，载体与片段的摩尔比控制在1:3-1:8，请根据凝胶电泳或紫外分光光度计检测后的浓度及载体与片段分子大小来计算其摩尔比。加入过多的片段反而会干扰连接反应：

10×T4 DNA Ligation Buffer :

组成成分	体 积
10×T4 DNA Ligation Buffer	1 μ l
T4 DNA Ligase (3 U/ μ l)	1 μ l
pGM-T载体 (50 ng/ μ l)	1 μ l
目的PCR片段/对照/Control Insert DNA	X μ l/1 μ l
ddH ₂ O	补足至10 μ l

2×T4 DNA Rapid Ligation Buffer:

组成成分	体 积
2×T4 DNA Rapid Ligation Buffer	5 μ l
T4 DNA Ligase (3 U/ μ l)	1 μ l
pGM-T载体 (50 ng/ μ l)	1 μ l
目的PCR片段/对照/Control Insert DNA	X μ l/1 μ l
ddH ₂ O	补足至10 μ l

本试剂盒提供10×T4 DNA Ligation和2×T4 DNA Rapid Ligation两种buffer，切勿将两者加入到同一离心管中。

5. 轻轻弹动离心管以混合内容物，短暂离心。如果选择10×T4 DNA Ligation Buffer，请将混合反应液置于22-26°C水浴反应1-2 h（如室温在此范围内，可置于室温放置1-2 h）或16°C过夜；如果选择2×T4 DNA Rapid Ligation Buffer，请将混合反应液置于22-26°C反应5-10 min（反应时间不要超过15 min，否则会降低连接效率）。反应结束后，将离心管置于冰上。

注意：我们推荐您使用10×T4 DNA Ligation Buffer，16°C过夜连接。

6. 转化

a) 转化平板的制备

向铺好的含有相应抗生素的固体琼脂平板表面加入16 μl 的IPTG (50 mg/ml)、40 μl 的X-Gal (20 mg/ml)，使用无菌的弯头玻璃棒将其均匀的涂开，避光置于37 $^{\circ}\text{C}$ 放置1-3 h，使溶解X-Gal的二甲基甲酰胺尽量挥发干净。

b) 转化

- i. 取部分连接产物加到50-100 μl TOP10感受态细胞中（感受态细胞应刚从-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出放于冰浴上，待刚刚解冻时加入连接产物，连接产物的加入量不超过感受态细胞体积的十分之一），轻弹混匀，冰浴30 min（必要时请使用超螺旋质粒pUC19同步转化感受态细胞作为对照检测转化效率，将1 μl pUC19加入另一只感受态细胞管中，其余的操作步骤与连接产物的转化步骤同步进行）。
- ii. 将离心管置于42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴90 sec，取出管后立即置于冰浴中放置2-3 min，其间不要摇动离心管。
- iii. 向离心管中加入250-500 μl 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的SOC或LB（不含抗生素）培养基，150 rpm、37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养45 min。目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达，使菌体复苏。
- iv. 将离心管中的菌液混匀，吸取100 μl 加到含相应抗生素的SOB或LB固体琼脂培养基上，用无菌的弯头玻璃棒轻轻的将细胞均匀涂开。待平板表面干燥后，倒置平板，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养12-16 h。

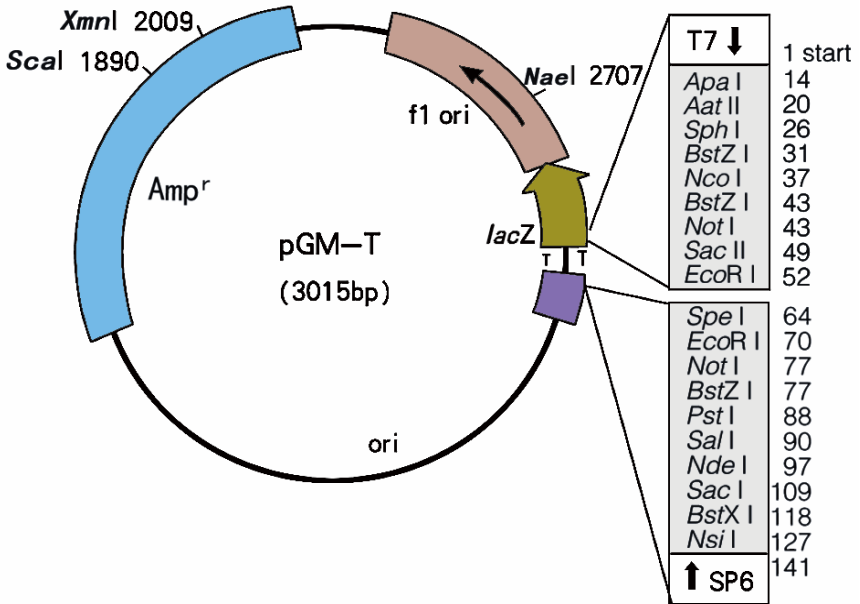
7. 检测

- a) 常规检测：将得到的白色菌落接种1-5 ml LB（含有终浓度为50-100 $\mu\text{g/ml}$ 的氨苄青霉素）培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养过夜，保存菌种后提取质粒，应用PCR或酶切方法鉴定插入片段是否正确。
- b) 快速检测：挑取白色菌落直接进行PCR检测（具体方法见分子克隆第三版）。
- c) 测序鉴定：使用常规或快速方法进行初步的鉴定后进行序列的测定。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

1. 转化过程中使用对照片段做对照是非常必要的，在实验出现问题时可以确定原因。
2. 建议留下部分连接产物，在出现问题后能迅速的补救，减少不必要的重复实验。
3. 涂布用量可根据具体实验作相应调整。如转化的DNA总量较多，可取更少量转化产物涂布平板；反之，如转化的DNA总量较少，可取200-300 μl 转化产物涂布平板。如果预计的克隆较少，可通过离心（4000 rpm，2 min）后吸除部分培养液，留下适量的培养基悬浮菌体后将其涂布于一个平板中（涂布剩余的菌液可置于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，如果次日的转化菌落数过少可以将剩下的菌液再涂布新的培养板）。

pGM-T载体图谱



pGM-T载体多克隆位点

