

● 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 *Sa* I 识别位点之间插入了 *Eco*R V 识别位点, 用 *Eco*R 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°C

● 纯度

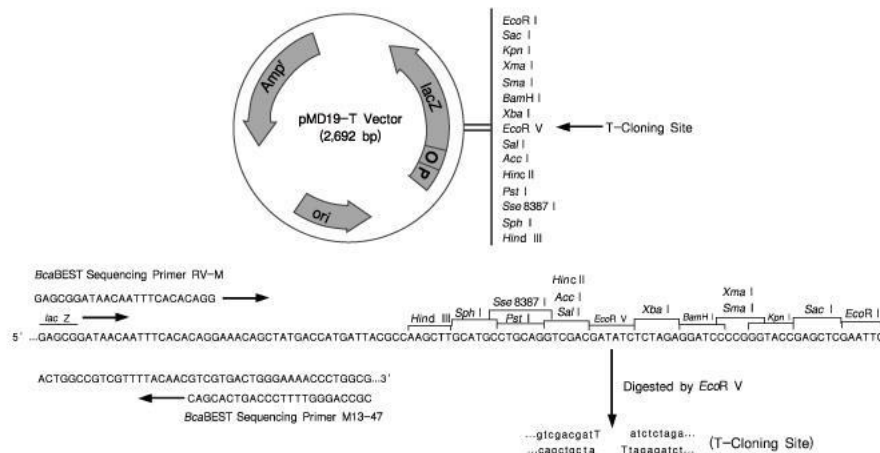
■ Control Insert 经克隆后的白色菌落中, 有 90%以上含有 Insert DNA 片段。

● 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



● 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 μl

Control Insert*₂ 1 μl

灭菌水 3 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。

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 μl。

试剂

使用量

pMD19-T Vector*₁

1 μl

Insert DNA*₃

0.1 pmol~0.3 pmol

灭菌水

up to 5 μl-3-

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



灭菌水 up to 5 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。

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 μ l 上述连接液 (10 ng Vector DNA) 加入到 microcentrifuge tubes 中, 冰上冷却 2 min。

5) 取 50 μ l *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 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。pMD19-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 0.15 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。-4-

● 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 \times 10⁵ cfu/ng=2 \times 10⁸ 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 $^{\circ}$ 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。-5-

● 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。建议使用切胶回收的 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 10⁸ 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。