

# GV pXT19-T Vector

Cat #: GT1502-20T

GV pXT19-T Vector 是一种高效克隆 PCR 产物 (TA Cloning) 的专用载体。本载体由 pUC19 载体改造而成, 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。它具有同 pUC19 载体相同的功能, 其  $\beta$ -半乳糖苷酶的表达活性高, 过夜培养即可见深蓝色菌落, 克隆后容易进行克隆体的蓝白斑筛选。同时, 本载体具有 Amp<sup>r</sup> 抗性基因, 有利于重组子的筛选。

## 一、试剂盒组成、储存、稳定性

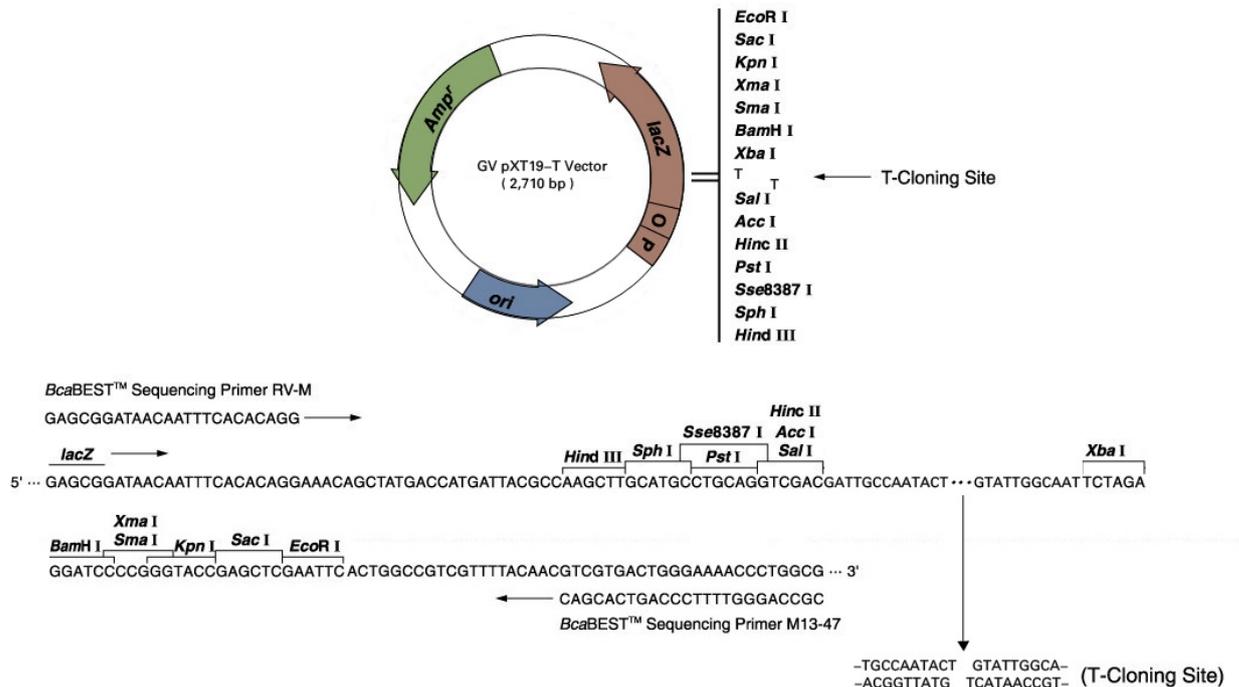
pXT19-T Vector (50 ng/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l x1 支
Control Insert (50 ng/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l x1 支
2 $\times$ Solution I	75 $\mu$ l x2 支
Primer M13 (-47) (10 $\mu$ M)	50 $\mu$ l
Primer RV-M (10 $\mu$ M)	50 $\mu$ l

保存: -20 $^{\circ}$ C

用途:

- 进行 TA 克隆, 克隆 PCR 产物
- 对克隆后的 PCR 产品使用 M13 Primers 进行 DNA 测序

## 二、GV pXT19-T Vector 的结构:



GV pXT19-T Vector 相关位点说明:

Cloning site	441
BcaBEST Sequencing Primer M13-47 binding site	352-375
BcaBEST Sequencing Primer RV-M binding site	504-527
LacZ operator	146-495
ColE1 ori	893-1481
Amp <sup>r</sup>	1652-2512

### 三、操作步骤

- 1、在微量离心管中配制下列 DNA 溶液，反应体系为 10  $\mu$  l

pXT19-T Vector (50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Insert DNA	0.1pmol—0.3pmol
2 $\times$ Solution I	5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	up to 10 $\mu$ l

- 2、16 $^{\circ}$ C 反应 30min，片段大于 1kb 时延长连接时间。  
 注：① 室温也能正常进行连接反应，但反应效率稍微降低。  
 ② 5min 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 (2kb 以上) 进行 DNA 克隆时，16 $^{\circ}$ C 连接反应时间请延长数小时或过夜。
- 3、连接液 10  $\mu$  l 加入至 100  $\mu$  l DH5a 感受态细胞中，冰浴放置 30min。
- 4、42 $^{\circ}$ C 热激 90s，立即冰浴放置 1-2min。
- 5、加入 900  $\mu$  l LB (或 SOC) 培养基，37 $^{\circ}$ C，160rpm 震荡培养 1h。
- 6、4000rpm 离心 1min，去掉部分上清，轻轻重悬管底沉淀，涂平板。
- 7、在含有 X-Gal、IPTG、Amp<sup>r</sup> 的 LB 琼脂平板上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜，形成单菌落。计数蓝/白斑菌落。
- 8、挑选白色菌落，PCR 鉴定插入片段的长度大小。

### 四、注意事项

- 1、2 $\times$  Solution I 请于冰浴中融解。
- 2、按照本实验操作连接后，直接进行转化时的连接液不要超过 20  $\mu$  l。当要转化的 DNA 量较大或准备进行电转时，需对连接液进行乙醇沉淀，纯化 DNA 后再进行转化。
- 3、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。
- 4、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，使用试剂盒中的 Control Insert，经克隆后的白色菌斑中，有 90% 以上含有 Insert DNA 片段，试剂盒提供可以进行 10 次阳性对照实验。
- 5、本制品的 2 $\times$  Solution I 可以用于载体构建中的连接反应，克隆数目跟目的基因和载体片段的纯度、浓度有关。

### 五、相关说明

- 1、感受态的选择

本产品来源于 pUC19 载体，适合 pUC19 载体的感受态细胞都可以使用，如：DH5a，JM109 等  
 转化时请使用高效率的热转化感受态细胞 (DH5a、JM109 等)，这样才能得到比较理想的阳性克隆。如果需要蓝白斑筛选时，宿主细胞必须具有正确的基因型 F' 编码的 LacZ $\Delta$ M15 产生 w Fragment 才可能和载体 DNA 产生的 LacZa 多肽相结合，表现出  $\beta$ -半乳糖苷酶活性 ( $\alpha$ -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。切胶回收时可使用 Genview 试剂盒：GV-High Efficiency Agarose Gel DNA Purification Kit Cat #: GV-GX-50。DNA 片段纯化回收试剂盒可使用 Genview 试剂盒：GV-High Efficiency DNA Purification Kit Cat #: GV-PCR-P-50

- 3、Insert DNA 的用量的计算方法

进行克隆时，Vector DNA 和 Insert DNA 的摩尔比一般为：1: 2—1: 10，我们可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 的用量的计算方法如下：

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

本载体 1  $\mu$  l (50ng) 的摩尔数约为 0.03pmol。

- 4、阳性克隆的检测

DNA 片段成功插入至 pXT19-T Vector 中后，一般情况下  $\beta$ -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<sup>r</sup> 的 LB 琼脂平板培养基上培养时将显示白色菌落。进行阳性克隆检测，建议使用 PCR 的方法，扩增引物可使用试剂盒中附带的：M13 (-47) (10  $\mu$  M) 和 RV-M (10  $\mu$  M)，对菌落直接进行 PCR 扩增检测。

- 5、转化效率的计算

转化子总数 = (菌落数  $\times$  稀释倍数  $\times$  转化反应原液总体积) / 涂板菌液体积

转化率 = 转化子总数 / 质粒 DNA 加入量 (每  $\mu$ g 超螺旋质粒 DNA)