TaKaRa Code：D104A

pMD®19-T Simple Vector

说明书

宝生物工程(大连)有限公司

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
• pMD®19-T Simple 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

pMD®19-T Simple 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，它消除了pUC19 载体上的多克隆酶切位点，再在pUC19 载体的多克隆酶切位点处导入了*Eco*R V酶切位点，使用*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。

本载体尽管消除了 *LacZ*基因上的多克隆酶切位点，但不影响β-半乳糖苷酶的正常表达，因此，PCR 产物克隆后仍可以利用 α-互补性进行蓝白菌落的筛选，挑选阳性克隆。

由于本载体上消除了多克隆酶切位点，克隆后的 PCR 产物将无法使用载体上的限制酶切下，需要在 PCR 扩增引物上导入合适的酶切位点。此时如果使用 PCR 扩增引物导入的酶切位点进行 DNA 酶切时，酶切反应将不会受到 T 载体上其它多克隆酶切位点上的限制酶影响，可以大大提高酶切效率，增加亚克隆成功率。

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pMD®18-T Simple 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

pMD®19-T Simple Vector（50 ng/μl）	20 μl×1 支
Control Insert（50 ng/μl）	10 μl×1 支
Solution I*	75 μl×2 支*

* 使用时请于冰中融解。

● 保　　存：-20℃

● 纯　　度

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

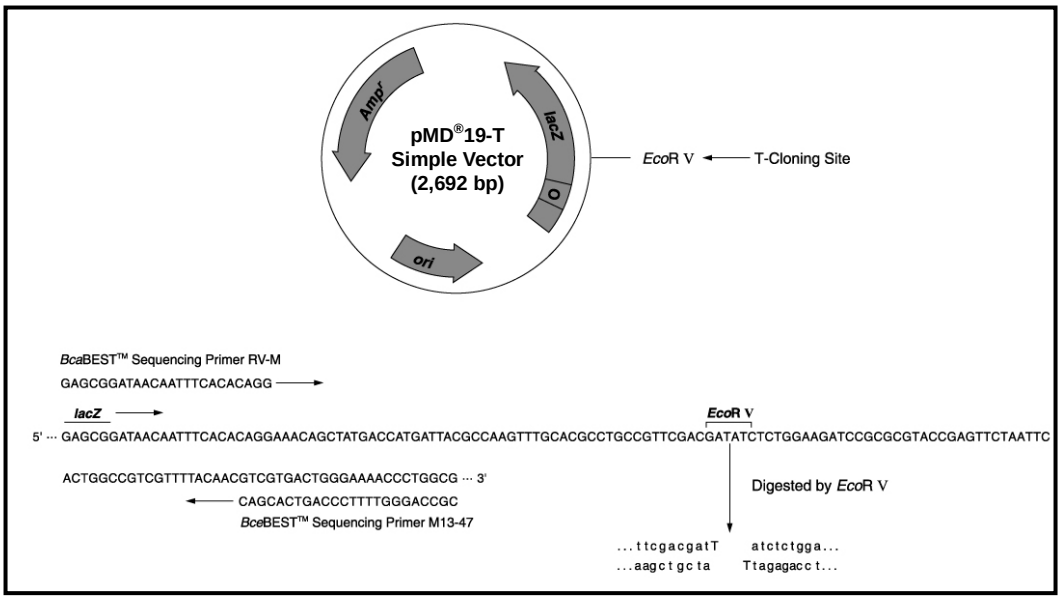
● 用　　途

- 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。

● pMD®19-T Simple Vector的结构

【pMD®19-T Simple Vector相关位点说明】

Cloning site	425
*Bca*BEST Sequencing Primer M13-47 binding site	352~375
*Bca*BEST 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 μl。

试剂	使用量
pMD®19-T Simple Vector*1	1 μl
Control Insert*2	1 μl
dH_2O	3 μl

2) 加入 5 μl (等量) 的 Solution I。

3) 16℃反应 30 分钟。

注) ① 室温 (25℃) 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℃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℃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：1.52×10^8 cfu/μg pUC19 DNA。

Control Insert	连接/转化效率 (cfu/μg Vector)	白色菌落比率 (%)	效率 (%) *
+	2.4×10^6	96.4	90 以上
-	2.1×10^5	46.1	0

* 效率是指白色菌落中的目的 DNA Insert 片段的插入效率。

■ 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 μl。

试剂	使用量
pMD®19-T Simple Vector*1	1 μl
Insert DNA*3	0.1 pmol ~ 0.3 pmol
dH_2O	up to 5 μl

2） 加入 5 μl（等量）的 Solution I。

3） 16℃反应 30 分钟。

注） ① 室温（25℃）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 μl）加入至 100 μl JM109 感受态细胞中，冰中放置 30 分钟。

5） 42℃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℃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
pMD®19-T Simple Vector *1	1 μl
Insert DNA*3	0.1 pmol ~ 0.3 pmol
dH_2O	up to 5 μl

2） 加入 5 μl（等量）的 Solution I。

3） 16℃反应 30 分钟。

注） ① 室温（25℃）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） 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℃预热 30 分钟），形成单菌落。计数白色、蓝色菌落。

*1 pMD®19-T Simple 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。pMD®19-T Simple 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≥1×10^8 cfu/μg 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*△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（TaKaRa Code：D301 或 DV805A）。

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×660×Insert DNA 的 bp 数
   本载体 1 μl（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®19-T Simple 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 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*Bca*BEST™ 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 μl的热转化感受态细胞中后，再加入 900 μl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 μl涂布平板（0.001 ng DNA/100 μl），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/μg pUC19 DNA。

● 使用注意

1. 由于载体上的多克隆酶切位点被破坏，所以使用本载体克隆 PCR 产物时，注意应在 PCR 引物上设计导入酶切位点，否则将会难以切下 DNA 片段进行其它亚克隆实验。
2. Solution I 请于冰中融解。
3. 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。
4. 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 μl。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核酸共沉剂（TaKaRa Code：D605A）可以提高 DNA 的回收率。
5. 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。
6. 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（TaKaRa Code：D301 或 DV805A ）。

3. 请使用转化效率大于 10^8 cfu/μg 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 目的 DNA 片段要亚克隆至其它载体（如：表达载体等），酶切位点应怎样选择？

A-4 因载体上无多克隆酶切位点，进行亚克隆时，酶切位点可以根据亚克隆载体的情况进行选择。进行 PCR 扩增时，应在 PCR 扩增用引物上预先导入合适的酶切位点，克隆至本载体后再使用该限制酶切下目的 DNA 片段，然后克隆至目的载体中。

Q-5 pMD®19-T Simple Vector与pMD®18-T Simple Vector相比有何不同？

A-5 pMD®19-T Simple Vector与pMD®18-T Simple 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。pMD®18-T Simple Vector连接转化后，一般要经 37℃过夜培养，然后再将其于冰箱内放置一段时间后，其蓝白菌落才能呈色。而pMD®19-T Simple Vector涂板培养后一般只需 10 个小时（37℃）便可以呈色。因此，pMD®19-T Simple Vector比pMD®18-T Simple 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 transfered, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co.,Ltd..

技术咨询热线：

0411-87641685，87641686
8008909508，4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号（116600）

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电　话：0411-87641681 87641683

传　真：0411-87619946 87621675

E.mail：service@takara.com.cn

网　址：http://www.takara.com.cn

V2011. 02