

pGEM-T 载体使用说明

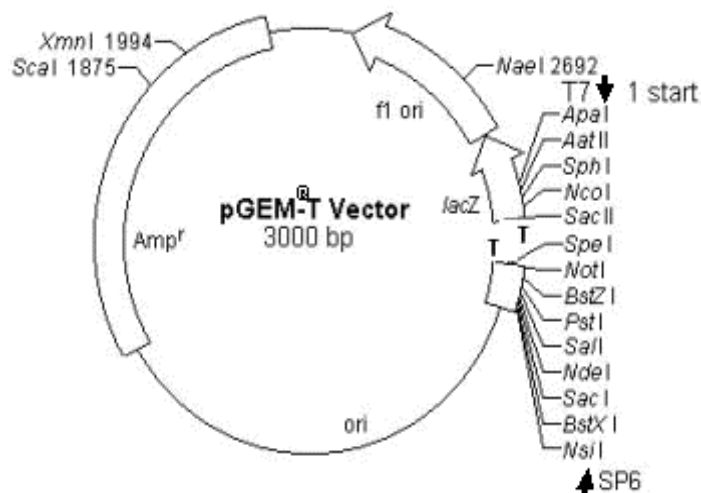
概述

经Taq DNA聚合酶扩增后的PCR产物末端都带有单个A。正是基于这一原理，pGEM质粒经EcoR V切成平端后，在开口端加上一个T制成T载体，一方面避免了自身环化，另一方面由于T-A互补，从而提高了T载体与PCR产物之间的连接效率。

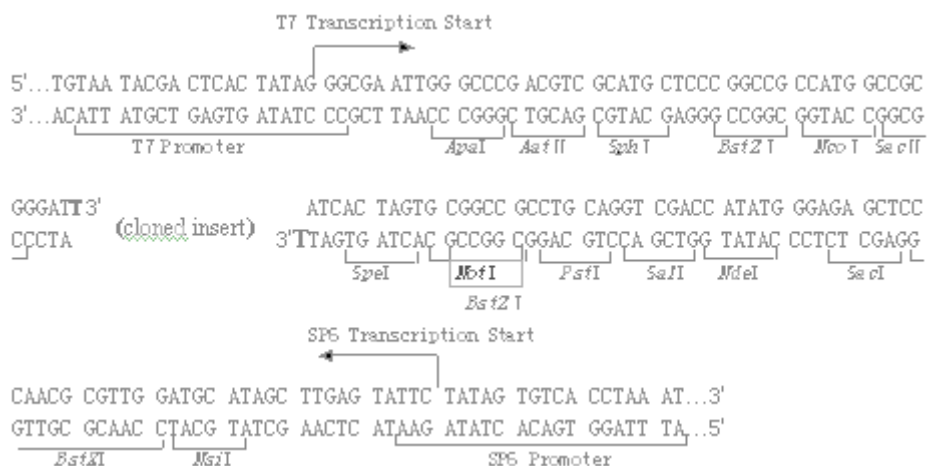
由于T-A克隆只需纯化PCR产物，因而操作较为简便。

pGEM-T vector含丝状噬菌体f1的复制起始区，用于产生环状ssDNA；含有T7和SP6 RNA聚合酶启动子；在多克隆区域具有编码β-半乳糖苷酶的基因(LacZ)，插入失活α-肽可在指示平板上通过蓝、白菌落直接筛选重组菌落。

pGEM-T Vector图谱



The promoter and multiple cloning sequence of the pGEM-T Vector



产品特点

1. 克隆PCR产物
2. 通过多克隆区域两侧的T7和SP6 RNA聚合酶启动子进行体外转录
3. 产生ssDNA
4. 通过蓝、白菌落筛选重组体
5. 多克隆区域提供选择克隆的酶切位点

包装及组成

pGEM-T载体(50ng/μl) 20μl 20次

操作方法

A. 连接

在0.2ml或0.5ml反应管中加入下列成分

pGEM-T	50ng
纯化的PCR产物	10-50ng
T4连接酶	2-3weiss units
10×连接缓冲液	1μl

补超纯水至总体积为10μl，可以16℃或4℃过夜。

B. 转化

1. 将50μl感受态细胞JM109或DH5α于冰浴上解冻。

- 2、将 5 μ l 连接产物与感受态细胞混匀，冰浴 30 分钟。
- 3、42 $^{\circ}$ C 热休克 90 秒，立即冰浴 3-5 分钟。
- 4、加入 400 μ l 预冷的 LB 液体培养基，37 $^{\circ}$ C 轻摇培养 45-60 分钟。
- 5、取 200 μ l 在 LB 固体培养基（+Amp/IPTG/X-Gal）上铺板，自然干燥 5-10 分钟，37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。

C. 鉴定

经 12-16 小时培养后，培养皿上生长着许多白色和蓝色菌落，蓝色菌落只含有载体，而白色菌落为 DNA 重组子（载体+插入片段）。可通过 PCR、限制性酶切或测序进一步鉴定阳性克隆。

注：具有 3' \rightarrow 5' 外切核酸酶活性的高保真 DNA 聚合酶如 Pfu、Vent 聚合酶不能用于 T-A 克隆。



Shanghai ShineGene Molecular Bio-tech Co., Ltd.

Add: Floor 2, Building A, 328#, Wuhe Road, Shanghai 201109,

Tel: +86-21-54460832

Fax: +86-21-54460831

E-mail: shinegene@vip.163.com

Website: www.synthesisgene.com