

pEASY[®]-T1 Cloning Kit

T1基因克隆试剂盒（双抗性）

使用前请仔细阅读说明书

目录号: CT101

保存: *Trans1*-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell -70℃及其以下温度下保存六个月，其它-18℃及其以下温度下保存九个月。

产品说明

pEASY[®]-T1 Cloning Vector包含*LacZ* 基因，在含有IPTG和X-gal 的平板培养基上，可进行蓝白斑筛选，适用于TA克隆。

特点

- 快速：仅需5分钟。
- 简单：加入片段即可。
- 高效：阳性率高。
- 提供氨苄青霉素和卡那霉素两种筛选标记，便于根据实验选择筛选标记。
- 酶切位点较多，亚克隆方便。
- 测序引物：M13 Forward Primer, M13 Reverse Primer, T7 Promoter Primer。
- T7 Promoter用于体外转录。
- *Trans1*-T1感受态细胞转化效率高，生长速度快，确保克隆数，节约筛选时间。

试剂盒组成

Component	CT101-01 (20 rxns)	CT101-02 (60 rxns)
<i>pEASY</i> [®] -T1 Cloning Vector (10 ng/μl)	20 μl	3×20 μl
Control Template (5 ng/μl)	5 μl	5 μl
Control Primers (10 μM)	5 μl	5 μl
M13 Forward Primer (10 μM)	50 μl	150 μl
M13 Reverse Primer (10 μM)	50 μl	150 μl
<i>Trans1</i> -T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell	10支 (100 μl/支)	30支 (100 μl/支)

基因克隆操作

1、PCR产物的制备

- (1) 引物要求：引物不能磷酸化。
- (2) 酶的选择：*Taq*系列的DNA 聚合酶。
- (3) 反应条件：为了保证扩增产物的完整性，扩增反应需要5-10分钟后延伸。反应结束后，电泳检测PCR产物的量和质量。
如果扩增产物有多条带，建议凝胶回收目的片段。

2、克隆反应体系

(1) 加入

Component	Volume
PCR Product	0.5-4 μl
<i>pEASY</i> [®] -T1 Cloning Vector	1 μl

- (2) 轻轻混合，室温 (20℃-37℃) 反应5分钟。反应结束后，将离心管置于冰上。

3、推荐克隆反应条件

- 最佳插入片段DNA量
载体与片段摩尔比=1:7
可以粗略地按照“1 kb 20 ng”的比例计算。(如1 kb加20 ng、1.5 kb加30 ng等)
- 最佳载体使用量：1 μl
- 最佳反应体系：3-5 μl，体积不足时可以补充无菌水。
- 最佳反应时间
 - (1) 片段长度为0.1-1 kb (含1 kb): 5-10 min*
 - (2) 片段长度为 1-2 kb (含2 kb): 10-15 min*
 - (3) 片段长度为 2-3 kb (含3 kb): 15-20 min*
 - (4) 片段长度为3 kb 以上: 20-30 min*

* 片段为胶回收产物，反应时间取最大值。
- 最佳反应温度：25℃，如片段是高GC含量，可以37℃反应。(推荐用PCR 仪控温)



4、转化

- (1) 加连接产物于50 μ l *Trans1*-T1感受态细胞中 (在感受态细胞刚刚解冻时加入连接产物), 轻弹混匀, 冰浴20-30分钟。
- (2) 42°C水浴热激30秒, 立即置于冰上2分钟。
- (3) 加250 μ l平衡至室温的SOC或LB培养基, 200 rpm、37°C培养1小时。
- (4) 取8 μ l 500 mM IPTG和40 μ l 20 mg/ml X-gal混合, 均匀地涂在准备好的平板上, 37°C培养箱中放置30分钟。
- (5) 待IPTG和X-gal被吸收后, 取200 μ l菌液均匀地涂在平板上, 在37°C培养箱中过夜培养 (为得到较多克隆, 1,500 $\times$ g离心1分钟, 弃掉部分上清, 保留100-150 μ l, 轻弹悬浮菌体, 取全部菌液涂板)。

阳性克隆检测

1、PCR方法鉴定阳性克隆

- (1) 挑选白色单克隆至10 μ l无菌水中, 涡旋混合。
- (2) 取1 μ l混合液于25 μ l PCR体系, 用M13 Forward Primer和M13 Reverse Primer鉴定阳性克隆。
- (3) PCR

94°C	10 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	x min*	
72°C	5-10 min	*根据片段的长度确定延伸时间。如果载体自连, 自连带长度为199 bp。

2、限制性酶切分析阳性克隆

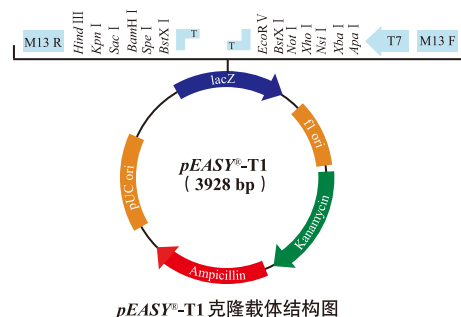
挑选白色克隆接种于LB/Amp^r或LB/Kan^r的液体培养基中, 200 rpm、37°C培养6小时左右。用试剂盒小量提取质粒, 选择适宜的限制性内切酶, 酶切鉴定阳性克隆。

- 3、测序: 用M13 Forward Primer, M13 Reverse Primer, T7 promoter 引物测序, 进行序列分析。

对照片段 (700 bp) PCR 体系与条件

Components	Volume	Final Concentration
Control Template	1 μ l	0.1 ng/ μ l
Control Primers (10 μ M)	1 μ l	0.2 μ M
2 $\times$ EasyTaq [®] PCR SuperMix	25 μ l	1 $\times$
Nuclease-free Water	Variable	-
Total volume	50 μ l	-

PCR	
94°C	2-5 min
94°C	30 sec
55°C	30 sec
72°C	1 min
72°C	10 min



LacZa fragment: bases 1-544
M13 reverse priming site: bases 205-221
Multiple cloning site: bases 234-354
T7 promoter priming site: bases 361-380
M13 forward priming site: bases 387-403
f1 origin: bases 545-982
Kanamycin resistance ORF: bases 1316-2110
Ampicillin resistance ORF: bases 2128-2988
pUC origin: bases 3133-3806

M13 Reverse Primer		Hind III	Kpn I	Sac I	BamHI	Spe I	BstXI
CAG GAA ACA GCT ATG A	ATG ATT ACG CCA AGC TTG	GTA CCG AGC TCG	GAT CCA CTA GTA ACG	GCC GCC AGT GTG CTG	GAA TTG		
GTC CTT TGT CGA TAC T	GAC TAA TGC TGT TCG AAC	CAT GGC TCG AGC CTA	GGT GAT CAT TGC CGG	CGG TCA CAC GAC CTT	AAC		
T7 Promoter		EcoRV	BstXI	Not I	Xho I	Nsi I	Xba I
CCC TT	AA GGG CAA TTC TGC	AGA TAT CCA TCA	CAC TGG	CGG CCG CTC	GAG CAT GCA TCT	AGA GGG CCC	AAT
GGG AA	TT CCC GTT AAG ACG	TCT ATA GGT AGT	GTG ACC GCC GGC	GAG CTC GTA CGT	AGA TCT CCC GGG	TTA	
M13 Forward Primer							
TCG CCC TAT AGT GAG	TCG TAT TA	C AAT TCA	CTG GCC GTC GTT	TTA CAA	CGT CGT GAC TGG	GAA AAC	
AGC GGG ATA TCA CTC	AGC ATA AT	G TTA AGT	GAC CGG CAG CAA	AAT GTT	GCA GCA CTG ACC	CTT TTG	

本产品仅供研究, 不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务电话: +86-10-57815020

服务邮箱: complaints@transgen.com

