

pEASY[®]-Blunt Simple Cloning Kit Blunt Simple基因克隆试剂盒(双抗性、平末端)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: CB111

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[®]-Blunt Simple Cloning Vector消除了*pEASY*[®]-Blunt Cloning Vector上的多克隆位点, 克隆后的PCR产物无法使用*pEASY*[®]-Blunt Cloning Vector上多克隆位点的限制性内切酶切下。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, 适用于平端克隆。

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。
- 方便在目的基因上设计酶切位点。
- 测序引物: M13 Forward Primer, SR 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	CB111-01 (20 rxns)	CB111-02 (60 rxns)
<i>pEASY</i> [®] -Blunt Simple 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
SR 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: 扩增产物为平端的高保真DNA聚合酶, 如*FastPfu*, *KD Plus* DNA Polymerase。
- (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> [®] -Blunt Simple 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 *Trans*1-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101 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 F, SR 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 $\times$ EasyPfu 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 1-446
M13 reverse priming site: bases 205-221
T7 promoter priming site: bases 263-282
M13 forward priming site: bases 289-305
f1 origin: bases 447-884
Kanamycin resistance ORF: bases 1218-2012
Ampicillin resistance ORF: bases 2030-2890
pUC origin: bases 3035-3708

pEASY[®]-Blunt Simple克隆载体结构图

SR Primer	M13 Reverse Primer
CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT C	CA GGA AAC AGC TAT GAC
GTC CGA AAT GTG AAA TAC GAA C	GTA CTA ATG CGG TTC GAC
T7 Promoter	M13 Forward Primer
GCC CTA TAG TGA GTC GTA TTAC	ACT GGC CGT CGT TTT AC
AA TTC	AAC GCG TCG TGA CTG GGA AAA C
GGG AA	TTC GGC GCA GCA AAA TG

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

