

# *pEASY*<sup>®</sup>-Blunt Cloning Kit

## Blunt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: CB101

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

### 产品说明

*pEASY*<sup>®</sup>-Blunt 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。
- 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   | CB101-01 (20 rxns) | CB101-02 (60 rxns) |
|---|--------------------|--------------------|
| <i>pEASY</i> <sup>®</sup> -Blunt 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: 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> <sup>®</sup> -Blunt Cloning Vector | 1 μl     |

- (2) 轻轻混合, 室温 (20°C-37°C) 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°C, 如片段是高GC含量, 可以37°C反应。(推荐用PCR 仪控温)



#### 4、转化

- (1) 加连接产物于50  $\mu$ 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 $^{\circ}$ C水浴热激30秒, 立即置于冰上2分钟。
- (3) 加250  $\mu$ l平衡至室温的SOC或LB培养基, 200 rpm、37 $^{\circ}$ C培养1小时。
- (4) 取8  $\mu$ l 500 mM IPTG和40  $\mu$ l 20 mg/ml X-gal混合, 均匀地涂在准备好的平板上, 37 $^{\circ}$ C培养箱中放置30分钟。
- (5) 待IPTG和X-gal被吸收后, 取200  $\mu$ l菌液均匀地涂在平板上, 在37 $^{\circ}$ C培养箱中过夜培养 (为得到较多克隆, 1,500 $\times$ 离心1分钟, 弃掉部分上清, 保留100-150  $\mu$ 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  $\mu$ l无菌水中, 涡旋混合。
- (2) 取1  $\mu$ l混合液于25  $\mu$ l PCR体系, 用M13 Forward Primer和M13 Reverse Primer鉴定阳性克隆。
- (3) PCR

|                 |          |                                      |
|-----------------|----------|--------------------------------------|
| 94 $^{\circ}$ C | 10 min   | } 30 cycles                          |
| 94 $^{\circ}$ C | 30 sec   |                                      |
| 55 $^{\circ}$ C | 30 sec   |                                      |
| 72 $^{\circ}$ C | x min*   |                                      |
| 72 $^{\circ}$ 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200 bp。 |

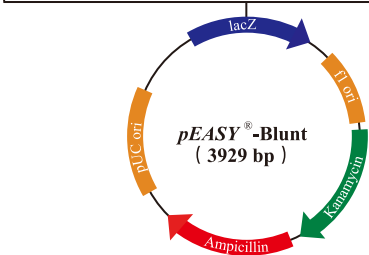
##### 2、限制性酶切分析阳性克隆

挑选白色克隆接种于LB/Amp<sup>r</sup>或LB/Kan<sup>r</sup>的液体培养基中, 200 rpm、37 $^{\circ}$ 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, M13 R, T7 promoter 引物测序, 进行序列分析。

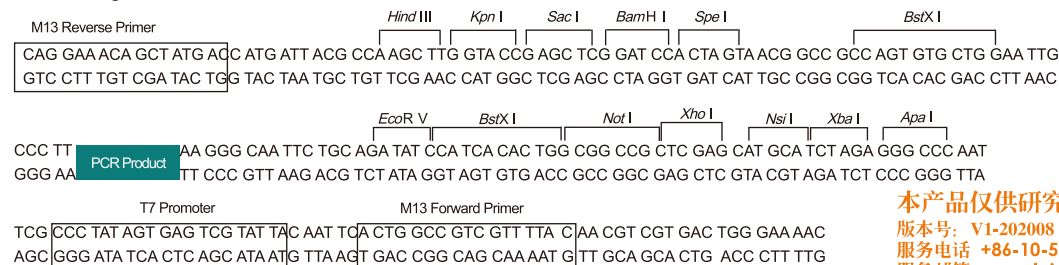
#### 对照片段 (700 bp) PCR 体系与条件

| Component                       | Volume     | Final Concentration | PCR                     |
|---------------------------------|------------|---------------------|-------------------------|
| Control Template                | 1 $\mu$ l  | 0.1 ng/ $\mu$ l     | 94 $^{\circ}$ C 2-5 min |
| Control Primers (10 $\mu$ M)    | 1 $\mu$ l  | 0.2 $\mu$ M         | 94 $^{\circ}$ C 30 sec  |
| 2 $\times$ EasyPfu PCR SuperMix | 25 $\mu$ l | 1 $\times$          | 55 $^{\circ}$ C 30 sec  |
| Nuclease-free Water             | Variable   | -                   | 72 $^{\circ}$ C 1 min   |
| Total Volume                    | 50 $\mu$ l | -                   | 72 $^{\circ}$ C 10 min  |



pEASY<sup>®</sup>-Blunt 克隆载体结构图

LacZa fragment: bases 1-545  
 Multiple cloning site: bases 234-355  
 M13 reverse priming site: bases 205-221  
 M13 forward priming site: bases 388-404  
 T7 promoter priming site: bases 362-381  
 fl origin: bases 546-983  
 Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111  
 Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989  
 pUC origin: bases 3134-3807



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

