

# pEASY<sup>®</sup>-T1 Simple Cloning Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: CT111

保存: *Trans1*-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell -70℃保存六个月, 其它-20℃保存九个月。

## 产品说明

*pEASY*<sup>®</sup>-T1 Simple Cloning Vector消除了*pEASY*<sup>®</sup>-T1 Cloning Vector上的多克隆位点, 克隆后的PCR产物无法使用*pEASY*<sup>®</sup>-T1 Cloning Vector上多克隆位点的限制内切酶切下, 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。
- 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  | CT111-01 (20 rxns) | CT111-02 (60 rxns) |
|--|--------------------|--------------------|
| <i>pEASY</i> <sup>®</sup> -T1 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: *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> <sup>®</sup> -T1 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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°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°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  $\mu$ 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°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100 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>+</sup>或LB/Kan<sup>+</sup>的液体培养基中, 200 rpm、37°C培养6小时左右。用试剂盒少量提取质粒, 选择适宜的限制性内切酶, 酶切鉴定阳性克隆。

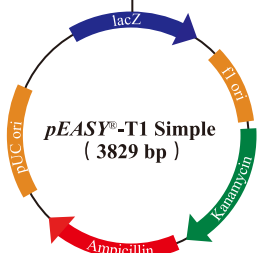
3、测序: 用M13 Forward Primer, SR primer, T7 promoter 引物测序, 进行序列分析。

#### 对照片段 (700 bp) PCR 体系与条件

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

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

} 30 cycles



**pEASY-T1 Simple 克隆载体结构图**

*LacZa* fragment: bases 1-445  
M13 reverse priming site: bases 205-221  
T7 promoter priming site: bases 262-281  
M13 forward priming site: bases 288-304  
f1 origin: bases 446-883  
Kanamycin resistance ORF: bases 1217-2011  
Ampicillin resistance ORF: bases 2029-2889  
pUC origin: bases 3034-3707

SR Primer  
CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT C G C G C T A T T G T G T G G A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T T C A C A C A G G A A A C A G C T A T G A C C A T G A T T A C G C C A A G C T G  
G T C G G A A A T G T G A A A T A C G A A G G C G A G C A T A C A A C A C A C C T T A A C A C T G C C C A T T G T T A A A G T G T G T C C T T T G T C G A T A C T G T G A T A C A T G C G G T T C G A C

T7 Promoter  
C C C T T T A G G G C A G C T T C A A T T C G C C T A T A G T G A G T C G T A T T A C A A T T C A A T T C A C T G G C G C G T C G T T T A C A A C G T C G T G A C T G G A A A C  
G G G A T T C C C G T C G A A G T T A A G C G G A T A T C A C T C A G C A T A A T G T T A A G T G A C C G G C A G C A A A A T G T T G C A G C A C T G A C C C T T T T G

M13 Reverse Primer  
M13 Forward Primer

本产品仅供研究, 不用于临床诊断。

版本号: V1-202008

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

