

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

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°C保存六个月, 其它-20°C保存九个月。

## 产品说明

pEASY<sup>®</sup>-Blunt Simple Cloning Vector消除了pEASY<sup>®</sup>-Blunt Cloning Vector上的多克隆位点, 克隆后的PCR产物无法使用pEASY<sup>®</sup>-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)
pEASY <sup>®</sup> -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-T1</i> 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
pEASY <sup>®</sup> -Blunt Simple 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 *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 $^{\circ}$ 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 $\times$ 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, 涡漩混合。
- (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

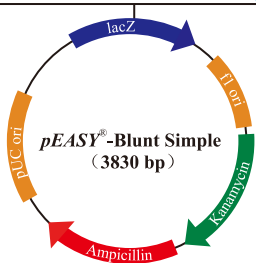
挑选白色克隆接种于LB/Amp<sup>r</sup>或LB/Kan<sup>r</sup>的液体培养基中, 200 rpm、37 $^{\circ}$ C培养6小时左右。用试剂盒小量提取质粒, 选择适宜的限制性内切酶, 酶切鉴定阳性克隆。

- 3、测序: 用M13 F, 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

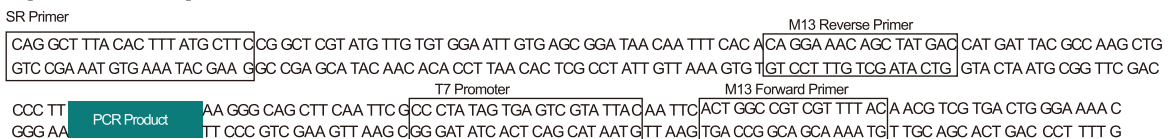
Components	Volume	Final Concentration
Control Template	1 $\mu$ l	0.1 ng/ $\mu$ l
Control Primers (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
2 $\times$ <i>EasyPfu</i> PCR SuperMix	25 $\mu$ l	1 $\times$
Nuclease-free Water	Variable	-
Total volume	50 $\mu$ l	-

PCR		
94 $^{\circ}$ C	2-5 min	} 30 cycles
94 $^{\circ}$ C	30 sec	
55 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	1 min	
72 $^{\circ}$ C	10 min	



*LacZ* $\alpha$  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*<sup>®</sup>-Blunt Simple 克隆载体结构图



本产品仅供研究, 不用于临床诊断。  
版本号: VI-202008  
服务投诉电话 +86-10-57815020  
服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

