

pEASY[®]-T3 Cloning Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: CT301

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[®]-T3 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。
- 提供氨苄青霉素筛选标记。
- 提供双*EcoRI*和双*NotI*酶切位点, 酶切鉴定方便。
- 测序引物: M13 Forward Primer, M13 Reverse Primer, T7 Promoter Primer, SP6 Promoter Primer。
- T7 Promoter, SP6 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	CT301-01 (20 rxns)	CT301-02 (60 rxns)
<i>pEASY</i> [®] -T3 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

- 引物要求: 引物不能磷酸化。
- 酶的选择: *Taq*系列DNA聚合酶。
- 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> [®] -T3 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

- 片段长度为0.1-1 kb (含1 kb): 5-10 min*
- 片段长度为1-2 kb (含2 kb): 10-15 min*
- 片段长度为2-3 kb (含3 kb): 15-20 min*
- 片段长度为3 kb以上: 20-30 min*

*片段为胶回收产物时, 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

- 加连接产物于50 μl *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。
- 42°C水浴热激30秒, 立即置于冰上2分钟。



- (3) 加250 μl平衡至室温的SOC或LB培养基，200 rpm、37°C培养1小时。
- (4) 取8 μl 500 mM IPTG和40 μl 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 μl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×g离心1分钟，弃掉部分上清，保留100-150 μl，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 μl无菌水中，涡漩混合。
- (2) 取1 μl混合液于25 μl 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253 bp。

2、限制性酶切分析阳性克隆

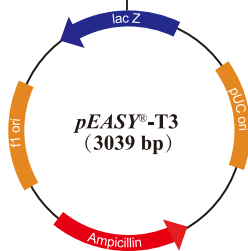
挑选白色克隆接种于LB/Amp^r的液体培养基中，200 rpm、37°C培养6小时左右。用试剂盒小量提取质粒，选择适宜的限制性内切酶，酶切鉴定阳性克隆。

3、测序：用M13 Forward Primer, M13 Reverse Primer, T7 Promoter Primer, SP6 Promoter Primer测序，进行序列分析。

对照片段 (700 bp) PCR 体系与条件

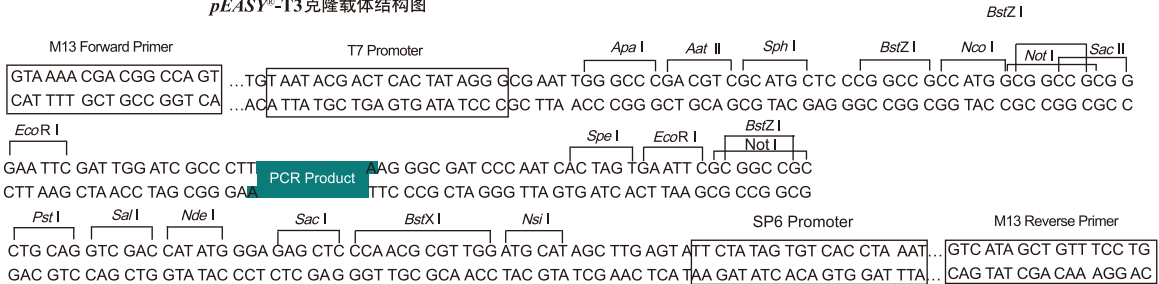
Component	Volume	Final Concentration
Control Template	1 μl	0.1 ng/μl
Control Primers (10 μM)	1 μl	0.2 μM
2×EasyTaq® PCR SuperMix	25 μl	1×
Nuclease-free Water	Variable	-
Total Volume	50 μl	-

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



pEASY[®]-T3克隆载体结构图

Lac operon sequence: bases 2860-3020,190-419
 Multiple cloning site: bases 10-152
 SP6 priming site: bases 163-182
 M13 reverse priming site: bases 200-216
LacZ start codon: base 204
Lac operator: bases 224-240
 pUC origin: bases 543-1216
 Ampicillin resistance ORF (c): bases 1361-2221
 fl origin: bases 2421-2858
 M13 forward priming site: bases 3000-3016
 T7 promoter priming site: bases 3023-3
 (c) = complementary strand



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

