

pEASY[®]-Blunt3 Cloning Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: CB301

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[®]-Blunt3 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	CB301-01 (20 rxns)	CB301-02 (60 rxns)
pEASY [®] -Blunt3 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-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 [®] -Blunt3 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

- (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 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254 bp。

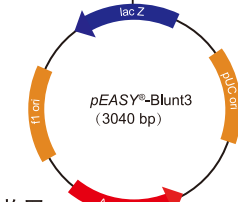
2、限制性酶切分析阳性克隆

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, 选择适当的限制性内切酶, 酶切鉴定阳性克隆。

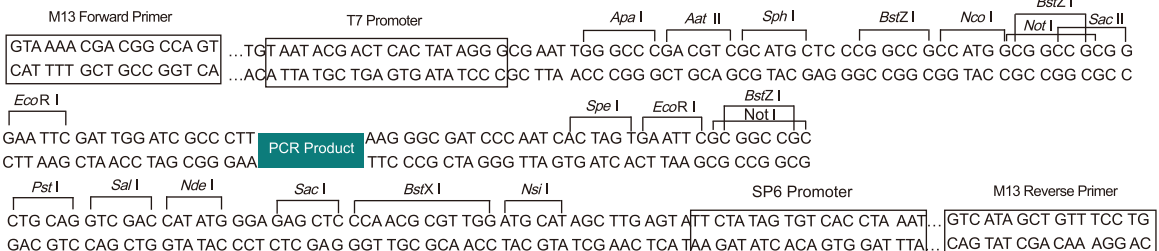
3、测序: 用M13 Forward Primer, M13 Reverse Primer, T7 Promoter Primer, SP6 Promoter Primer测序, 进行序列分析。

对照片段 (700 bp) PCR 体系与条件

Component	Volume	Final Concentration
Control Template	1 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	-



pEASY®-Blunt3 克隆载体结构图



Lac operon sequence: bases 2861-3021,191-420
Multiple cloning site: bases 10-153
SP6 priming site: bases 164-183
M13 reverse priming site: bases 201-217
LacZ start codon: base 205
Lac operator: bases 225-241
pUC origin: bases 544-1217
Ampicillin resistance ORF (c): bases 1362-2222
f1 origin: bases 2422-2859
M13 forward priming site: bases 3001-3017
T7 promoter priming site: bases 3024-3
(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

