

# pEASY<sup>®</sup>-T5 Zero Cloning Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: CT501

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

该载体通过自杀基因表达与否筛选阳性重组子。当载体与片段连接成功时, 自杀基因无法正确表达, 包含重组子的细胞可以正常生长; 当载体与片段连接不成功时, 自杀基因正确表达, 包含载体的细胞无法生长, 即“Zero”背景。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: 阳性率接近于100%。
- 背景接近于零。
- 无需蓝白斑筛选。
- 适用于短片段、长片段克隆。
- 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。
- T3 Promoter, 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	CT501-01 (20 rxns)	CT501-02 (60 rxns)
pEASY <sup>®</sup> -T5 Zero 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: *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
pEASY <sup>®</sup> -T5 Zero 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200  $\mu$ l菌液涂板, 培养过夜(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, 培养过夜)。

#### 阳性克隆检测

##### 1、PCR方法鉴定阳性克隆

- (1) 挑选单克隆至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。

##### 2、限制性酶切分析阳性克隆

挑选克隆接种于LB/Amp<sup>+</sup>或LB/Kan<sup>+</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。

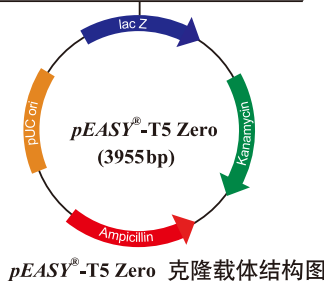
3、测序: 用M13 Forward Primer, M13 Reverse Primer引物测序, 进行序列分析。

#### 对照片段 (700 bp) PCR 体系与条件

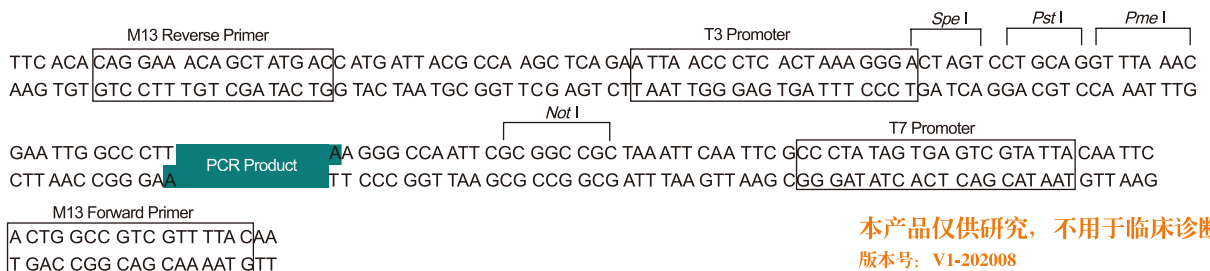
Component	Volume	Final Concentration
Control Template	1 $\mu$ l	0.1 ng/ $\mu$ l
Control Primers (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
2 $\times$ EasyTaq <sup>®</sup> PCR SuperMix	25 $\mu$ l	1 $\times$
Nuclease-free Water	Variable	-
Total volume	50 $\mu$ l	-

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

} 30 cycles



*LacZa* fragment: bases 217-809  
M13 reverse priming site: bases 205-221  
T7 promoter priming site: bases 327-346  
M13 Forward priming site: bases 353-369  
Kanamycin resistance ORF: bases 1158-1952  
Ampicillin resistance ORF (c): bases 2202-3062  
pUC origin: bases 3160-3833  
(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

