

pEASY[®]-Blunt Zero Cloning Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: CB501

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 | CB501-01 (20 rxns) | CB501-02 (60 rxns) |
|--|--------------------|--------------------|
| pEASY [®] -Blunt 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: 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 [®] -Blunt 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 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200 μ 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 μ 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 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。 |

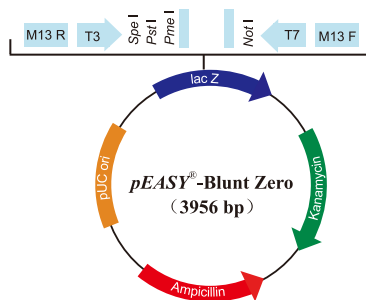
2、限制性酶切分析阳性克隆

挑选克隆接种于LB/Amp⁺或LB/Kan⁺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 | PCR |
|--|------------|---------------------|--------------|
| Control Template | 1 μ l | 0.1 ng/ μ l | 94°C 2-5 min |
| Control Primers (10 μ M) | 1 μ l | 0.2 μ M | 94°C 30 sec |
| 2 \times <i>EasyPfu</i> PCR SuperMix | 25 μ l | 1 \times | 55°C 30 sec |
| Nuclease-free Water | Variable | - | 72°C 1 min |
| Total volume | 50 μ l | - | 72°C 10 min |



pEASY[®]-Blunt Zero 克隆载体结构图

LacZ α fragment: bases 217-810

M13 reverse priming site: bases 205-221

T7 promoter priming site: bases 328-347

M13 Forward priming site: bases 354-370

Kanamycin resistance ORF: bases 1159-1953

Ampicillin resistance ORF (c): bases 2203-3063

pUC origin: bases 3161-3834

(c) = complementary strand

| | | | | | | | |
|--------------------|---|-------------------------------------|---------------------------------|-------------|-------|--------------------|-------|
| M13 Reverse Primer | | T3 Promoter | | | Spe I | Pst I | Pme I |
| TTC ACA | CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TCA GAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG A | ACT AGT | CCT GCA GGT | TTAAAC | | | |
| AAG TGT | GTC CTT TGT CGA TAC TGG TAC TAA TGC GGT TCG AGT CTT AAT TGG GAG TGA TTT CCC T | GATCA | GGA CGT CCA | AAT TTG | | | |
| | | Not I | | T7 Promoter | | M13 Forward Primer | |
| GAA TTG GCC CTT | AAG GGC CAA TTC GCG GCC GCT AAA TTC AAT TCG | CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAC AAT TCA | CTG GCC GTC GTT TTA CAA | | | | |
| CIT AAC CGG GAA | TTC CCG GTT AAG CGC CGG CGA TTT AAG TTA AGC | GGG ATA TCA CTC AGC ATA ATG | TTA AGT GAC CGG CAG CAA AAT GTT | | | | |

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

