

pEASY[®]-Blunt E1 Expression Kit

使用前请务必仔细阅读说明书

目录号: CE111

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[®]-Blunt E1 Expression Vector与pET载体骨架相似, 利用5分钟快速平端克隆技术克隆PCR产物; 利用*T7lac*启动子严谨调控、高效表达目的基因。对照插入片段750 bp, 表达的蛋白分子量约27 kDa。

特点

- 快速: 仅需5分钟。
- 简单: 加入片段即可。
- 高效: 阳性率高。
- *T7lac*启动子严谨调控表达。
- N端6×His蛋白纯化标签, 方便纯化重组蛋白。
- 配有E1 Expression Plasmid作为表达的阴性对照。
- 提供氨苄青霉素筛选标记。
- 测序引物: T7 Promoter Primer, T7 Terminator Primer。
- *Trans1*-T1感受态细胞克隆效率高, 生长速度快, 确保克隆数, 节约筛选时间。

试剂盒组成

Component	CE111-01 (10 rxns)
<i>pEASY</i> [®] -Blunt E1 Expression Vector (15 ng/μl)	10 μl
E1 Expression Plasmid (Negative Control) (15 ng/μl)	10 μl
EControl Template (5 ng/μl)	10 μl
EControl Forward Primer (10 μM)	10 μl
EControl Reverse Primer (10 μM)	10 μl
T7 Promoter Primer (10 μM)	50 μl
T7 Terminator Primer (10 μM)	50 μl
<i>Trans1</i> -T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell	5支 (100 μl/支)

基因克隆操作

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。

克隆反应体系

(1) 加入

Component	Volume
PCR Product	0.5-4 μl
<i>pEASY</i> [®] -Blunt E1 Expression 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。



推荐克隆反应条件

1、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)

2、最佳载体使用量：1 μl

3、最佳反应体系：3-5 μl，体积不足时可以补充无菌水。

4、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。

5、最佳反应温度：25℃

*如片段是高GC含量，可以37℃反应（推荐用PCR仪控温）。

转化

(1) 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。

(2) 42℃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℃培养1小时。

(4) 取200 μl 菌液均匀地涂在平板上，在37℃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

PCR方法鉴定正确表达方向的阳性克隆

挑选单克隆于10 μl无菌水中，涡旋混合，取1 μl混合液于25 μl PCR体系。用T7 Promoter Primer和目的基因反向引物鉴定阳性克隆，或用目的基因正向引物和T7 Terminator Primer鉴定阳性克隆。

PCR

94℃	10 min	} 30 cycles
94℃	30 sec	
55℃	30 sec	
72℃	x min*	
72℃	5-10 min	

*根据片段的长度确定延伸时间

限制性酶切分析阳性克隆

挑选正确表达方向的阳性克隆，200 rpm、37℃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。

测序：用T7 Promoter Primer和T7 Terminator Primer测序，确定序列的正确性。

目的基因表达

感受态细胞：BL21(DE3)表达感受态细胞系列均可用于表达。转化阳性克隆于BL21(DE3)表达感受态细胞系列(操作步骤同基因克隆操作相应部分)。如果表达毒基因，建议选择BL21(DE3)pLysS感受态细胞。

诱导：挑选单克隆，接种于5 ml LB/Amp^r培养基中，37℃ 250 rpm培养，当OD₆₀₀=0.5时，加入终浓度为0.1-1 mM IPTG 诱导表达。为了得到最佳的表达，建议试验不同的IPTG浓度和诱导时间。



表达验证: 表达结束后, 收集、处理菌体沉淀, 经SDS-PAGE后, 考马斯亮蓝染色检测蛋白的表达情况。
蛋白纯化参考ProteinIso® Ni-NTA Resin操作步骤。

注意事项

- 根据PCR产物的浓度, 增减PCR产物的量(0.5-4 μ l), 但是载体使用量不变。
- 反应时间绝对不能超过30分钟。
- 总反应体积不能超过5 μ l。
- 随着克隆片段的增加(>3 kb), 克隆效率降低。
- 若有引物二聚体, 建议使用PCR纯化试剂盒; 紫外照射不仅容易使DNA发生突变, 而且影响克隆效率。

常见问题分析

(1) 克隆效率低

影响克隆效率有许多因素, 如扩增目的基因所用引物, 基因结构, 插入片段和载体的比例等。
如发现克隆效率低, 尝试用下列方法提高克隆效率。

- 纯化PCR产物。
- 如插入片段的浓度太低, 增加插入片段的量。
- 用新鲜的PCR产物。

(2) PCR鉴定重组子失败

当用PCR方法鉴定重组子, 没有得到目的扩增产物, 又没有载体自连带, 说明PCR失败。重新优化PCR条件或提取质粒, 以质粒作模板或酶切鉴定包含重组子的克隆。

对照片段(750 bp) PCR体系与条件

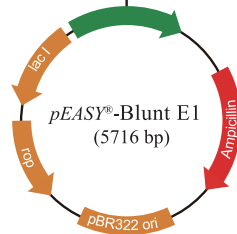
Component	Volume	Final Concentration
EControl Template	1 μ l	0.1 ng/ μ l
EControl Forward Primer (10 μ M)	1 μ l	0.2 μ M
EControl Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.2 μ M
2 \times TransStart® FastPfu PCR SuperMix	25 μ l	1 \times
Nuclease-free Water	variable	-
Total Volume	50 μ l	-

PCR

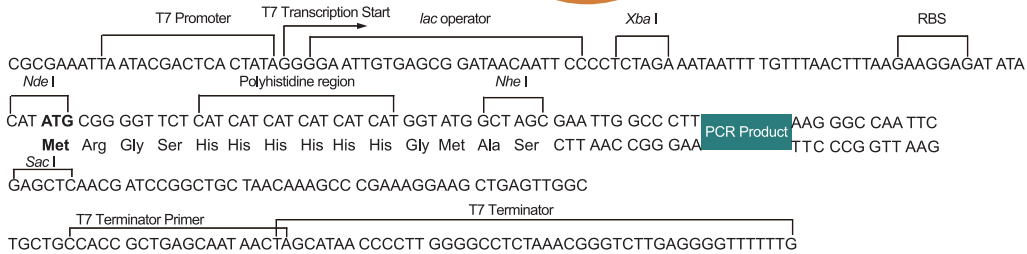
94°C	2-5 min	} 30 cycles
94°C	20 sec	
55°C	20 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5-10 min	



pEASY®-Blunt E1
表达载体结构图



T7 promoter: bases 209-225
 T7 transcription start: bases 226
 Lac operator(lacO): bases 228-252
 RBS: bases 282-288
 His-Tag coding sequence: bases 309-326
 T7 terminator: bases 436-482
 Ampicillin resistance ORF: bases 907-1767
 pBR322 origin: bases 1922-2541
 ROP ORF: bases 2953-3144
 LacI ORF: bases 4459-5547



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

