

pEASY[®]-T&B Simple Cloning Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: CTB111

保存: *Trans1*-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell -70℃保存六个月, 其它-20℃保存九个月。

产品说明

该载体包含*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。本产品使用独特的载体制备工艺, 可以兼容TA克隆与平末端克隆。

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%。
- 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。
- 方便在目的基因上设计酶切位点。
- 测序引物: M13 Forward Primer, M13 Reverse Primer。
- 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	CTB111-01 (20 rxns)	CTB111-02 (60 rxns)
pEASY [®] -T&B Simple 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

- (1) 引物要求: 引物不能磷酸化。
- (2) 酶的选择: TA克隆使用*Taq*系列的DNA聚合酶。平末端克隆使用扩增产物为平末端的高保真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 [®] -T&B Simple Cloning Vector	1 μl

(2) 轻轻混合, 室温 (20℃-37℃) 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℃, 如片段是高GC含量, 可以37℃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) 挑选单克隆至10 μ l无菌水中, 涡漩混合。
- (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

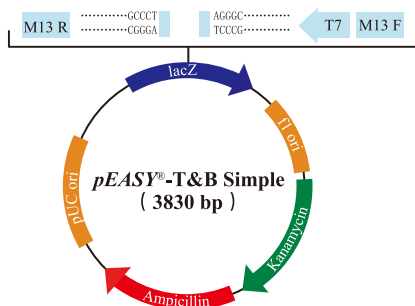
挑选白色克隆接种于LB/Amp⁺或LB/Kan⁺的液体培养基中, 200 rpm、37°C培养6小时左右。用试剂盒小量提取质粒, 选择适宜的限制性内切酶, 酶切鉴定阳性克隆。

3、测序: 用M13 Forward Primer, SR primer, T7 promoter 引物测序, 进行序列分析。

对照片段 (700 bp) PCR 体系与条件

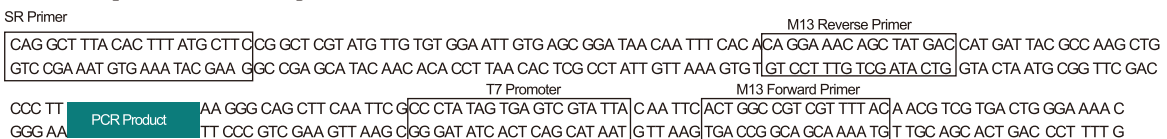
Components	Volume	Final Concentration
Control Template	1 μ l	0.1 ng/ μ l
Control Primers (10 μ M)	1 μ l	0.2 μ M
2 \times EasyTaq [®] PCR SuperMix	25 μ l	1 \times
Nuclease-free Water	Variable	-
Total volume	50 μ l	-

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



LacZa fragment: bases 1-446
M13 reverse priming site: bases 205-221
T7 promoter priming site: bases 262-282
M13 forward priming site: bases 289-305
f1 origin: bases 447-884
Kanamycin resistance ORF: bases 1218-2012
Ampicillin resistance ORF: bases 2030-2890
pUC origin: bases 3035-3708

pEASY[®]-T&B Simple克隆载体结构图



本产品仅供研究, 不用于临床诊断。

版本号: V1-202302

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

