

pEASY[®]-Blunt Zero Cloning Kit

Blunt Zero基因克隆试剂盒(双抗性、零背景、无蓝白斑筛选)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: CB501

版本号: Version 1.1

保存: *Trans1-T1* Phage Resistant Chemically Competent Cell -70°C及其以下温度下保存一年, 其它-18°C及其以下温度下保存一年。

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

- 引物要求: 引物不能磷酸化。
- 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。
- 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 *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°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。

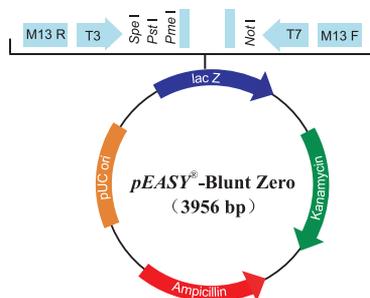
2、限制性酶切分析阳性克隆

挑选克隆接种于LB/Amp^r或LB/Kan^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

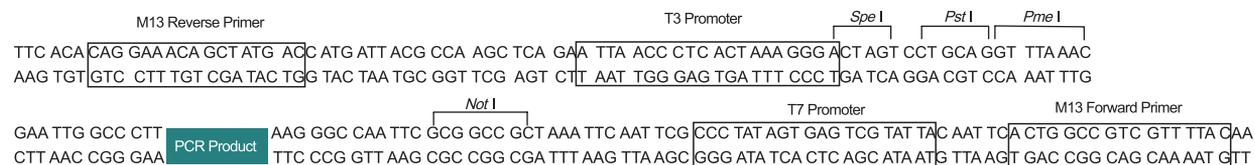
M13 Forward priming site: bases 354-370

Kanamycin resistance ORF: bases 1159-1953

Ampicillin resistance ORF (c): bases 2203-3063

pUC origin: bases 3161-3834

(c) = complementary strand



本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.1-202512

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

