

M5 pBLUE-T Simple Cloning Kit

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 pBLUE-T Simple Cloning Kit	20T	MF134-01
M5 pBLUE-T Simple Cloning Kit	4×20T	MF134-04

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 6 个月。使用后请及时放入-20°C 保存以保证酶的活性。

【产品简介】

pBLUE-T Simple Vector 是一种高效克隆 PCR 产物 (TA Cloning) 的专用载体。这种载体是由 pBlueScript II SK(+)质粒改建而成，和传统 T 载体 ECOR V 切开后加 T 方法不同，pSURE-T Simple 通过改造 pBlueScript II SK(+)，在原 pBlueScript II SK(+)多克隆位点引入 Xcm I 酶切后使其原多克隆位点两侧的 3' 末端直接产生未配对的 T 碱基，因此有更高的重组效率。同时它消除了 pBlueScript II SK(+)载体上的多克隆酶切位点，需要在 PCR 扩增引物上导入合适的酶切位点。

此时如果使用 PCR 扩增引物导入的酶切位点进行 DNA 酶切时，酶切反应将不会受到 T 载体上其它多克隆酶切位点上的限制酶影响，可以大大提高酶切效率，增加亚克隆成功率。

此外，本公司载体连接体系还有背景低（蓝斑小于 10%），重组率高（白斑中超过 90%有插入片段），可快速连接等特点。

本说明书未列出了 pBLUE-T Simple 载体相关的技术资料，其全序列可参照 pBlueScript II SK(+)序列，只是其多克隆酶切位点处序列稍有不同。

测序推荐采用 M13 通用测序引物和 T3 启动子引物（见后面图谱）。

【产品组份】

	20T	4×20T
pBLUE-T Simple Vector (30ng/μl)	20μl	80μl
1000bp Control (30ng/μl)	5μl	5μl
10x PEG Enhancer	50μl	200μl
10x Ligation Buffer	40μl	160μl
2x Quick Ligation Buffer	100μl	400μl
T4 DNA Ligase, 5U/ul	20μl	80μl

【操作步骤】

1. 连接反应的准备：

PCR产物是否要进行纯化取决于扩增产物的质量。如果PCR产物非常干净，不经纯化就可直接进行连接反应。但如果是以质粒为模板的PCR产物则必须进行纯化，模板质粒有可能也形成白斑。PCR产物可以通过琼脂糖凝胶电泳分离。本公司生产的DNA产物快速纯化回收试剂盒对70bp以上的DNA片段能很好地进行回收。

Taq、Tth、AmpliTaq、KlenTaq DNA聚合酶扩增的PCR产物，其末端都带有一个突出的3' -A。具有3' -A末端的PCR产物可以直接用pBLUE-T Simple 载体进行克隆连接。具有3'→5'外切酶活性的DNA聚合酶（高保真酶）扩增的PCR产物是平末端，要对这种平末端PCR产物进行克隆，应先进行3'-端加A工作。

2. 连接反应：

1) 在冰上下建立如下体系（10 μ l 体系）：

纯化后的 PCR 产物/或者 1 μ l 1000bp control	X* μ l
M5 pBLUE-T Simple Vector	1 μ l
10x PEG Enhancer	1 μ l
10x Ligation Buffer（用前充分溶解混匀）	1 μ l
T4 DNA Ligase（5 U/ μ l）	0.5-1 μ l
灭菌水补齐到	10 μ l

加完试剂后，用移液器轻轻吹打混匀或者轻弹管底混匀，低速瞬时离心收集所有液体在离心管底。

* 一般 PCR 产物与载体的摩尔比优化至 2:1~10:1（推荐 3:1）就可以得到良好结果（具体算法见后面）

2) 16 $^{\circ}$ C 连接过夜（一般可在 PCR 仪器或者水浴锅中完成）。

通常推荐 16 $^{\circ}$ C 连接过夜（10 μ l 体系标准连接酶量为 2.5 Weiss Units 即可），可以得到最多的转化子。但是本系统含 PEG Enhancer 可以提高连接效率数倍，在高连接酶量的情况下（10 μ l 体系推荐连接酶量为 5 Weiss Units）16 $^{\circ}$ C 连接 30 分钟即可达一般研究的要求。

3) 连接产物可直接转化感受态细胞或贮存于 -20 $^{\circ}$ C。<如尚未准备好感受态细胞，可以将连接产物短时间置于冰上备用>。

3. 转化：

1) 50-100 μ l 感受态细胞，置于室温解冻，完全解冻后（约 1 分钟左右）轻弹几次将细胞均匀悬浮。

2) 加入 5 μ l 连接液(最多可全部加入，只要体积不超过感受态细胞体积的 1/10)，轻轻混匀，冰上放置 30 分钟。42 $^{\circ}$ C 水浴热激 90 秒，冰上放置 2-3 分钟。

3) 加 300-500 μ l LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素)，37 $^{\circ}$ C 150 rpm 振荡培养 60 分钟。

4) 将 200 μ l 细菌涂布在预先用 16 μ l 50mg/ml IPTG 和 40 μ l 20 mg/ml X-gal 涂布的氨苄青霉素平板上。

涂布细菌的用量依连接的效率及感受态细胞的感受率而进行适当的调整，如果预计的克隆较少，可通过离心（4,000rpm，2 分钟）后吸除部分培养液，留下适量的培养基悬浮菌体后取全部或者适量涂布于一个平板中（涂布剩余的菌液可以搁在 4 $^{\circ}$ C 保存，第 2 天如果转化菌落数量少，可将剩余菌液全部涂一个新培养板）。

5) 平板在 37 $^{\circ}$ C 下正向放置 1 小时以吸收过多的液体，然后倒置培养过夜。

4. 转化子的筛选鉴定：

A、转化子的蓝白筛选：

当外源 DNA 片段插入到 pBLUE-T Simple 中后，由于外源 DNA 的核酸序列存在改变了 LacZ 基因的编码，从而影响了其产物 β -半乳糖苷酶 a-片段的活性，因此重组克隆在 X-gal/IPTG 平板上呈现为白色，而非重组克隆呈蓝色。有的时候插入片段没有影响 lacZ 基因读码框，或插入片段太小，这种情况下菌落（重组克隆）呈现淡蓝色或者在菌落中心呈现淡蓝斑点，外圈白色（鱼眼状蓝斑 fish eye）。选择在 IPTG/X-gal 平板上生长的白色菌落或者淡蓝色菌落，用牙签挑至含氨苄青霉素的液体培养基，37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

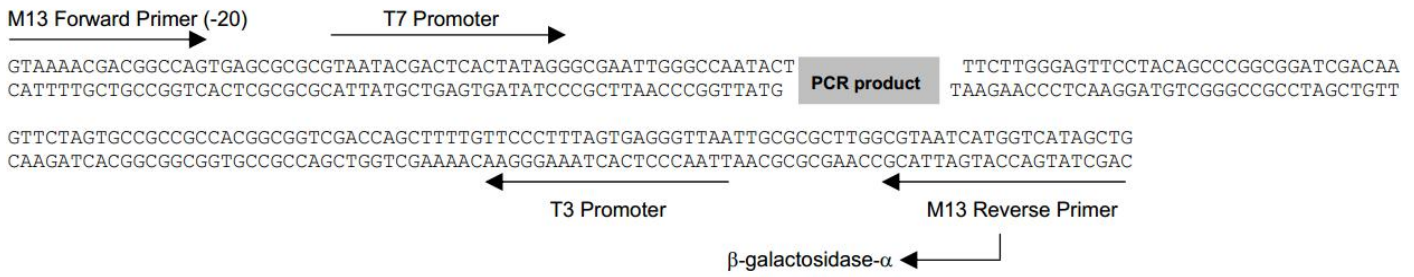
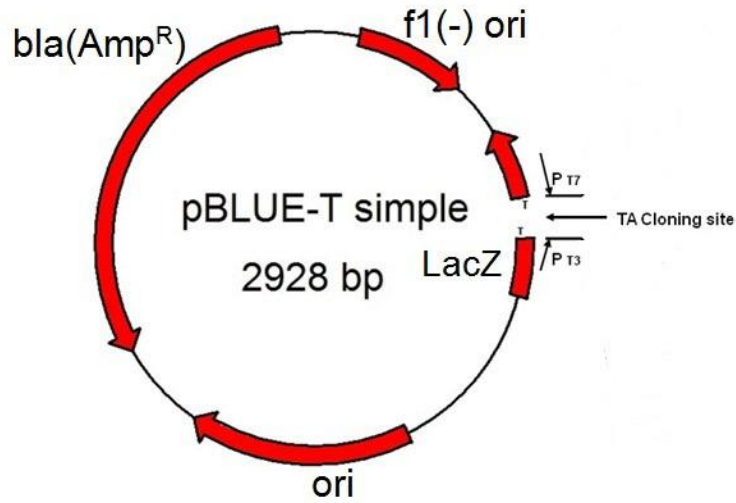
B、转化子的鉴定：

1)、用上述培养的白色菌落的菌液抽提质粒，用 ECOR I 单酶切或用其它合适的酶切，琼脂糖凝胶电泳检查片段大小，确定是否含有目的片段。

2)、挑取白色菌落直接进行 PCR 检测（可参见分子克隆第 3 版本或者咨询我们）

3)、用 T3 和 T7 启动子引物或其它合适的引物测序来确定是否含有目的克隆。

pBLUE-T Simple 载体图谱、启动子和多克隆位点序列（图一）：



一般 PCR 产物与载体的摩尔比优化至 2:1~10:1（推荐 3:1）就可以得到良好结果，可采用以下公式：

[加入载体的量 (ng) × 插入片段大小 (kb) ÷ 载体大小 (kb)] × 插入片段和载体的摩尔比 = 插入片段的量 (ng) 例如：插入片段和载体连接的摩尔比例为 3:1，如连接反应中加入载体 40ng，插入片段大小为 1000bp，这时应加入插入片段的量为 [40ng 载体 × 1kb 插入片段 ÷ 2.928kb 载体] × 3/1 = 40.1ng。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。