



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

版本号:2018-12-17

pBLUE-T快速克隆试剂盒

pBLUE-T Fast Cloning Kit

(目录号: ZC204) 含多克隆酶切位点

· 快速 · 简捷 · 背景低

- 实现5-10min快连, 无需过夜
- 重组率高, 克隆效率高达90%
- 需要蓝白斑筛选
- 适合Taq、Tth等系列产物的克隆

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

■ 产品组成

试剂盒组成	ZC204-1(20次)	ZC204-2(60次)
pBLUE-T Vector (30ng/μl)	20μl	3×20μl
5 × Quick Ligation Buffer	40μl	3×40μl
877bp Control (TA 50ng/μl)	5μl	5μl
T4 DNA Ligase (5 Weiss Units/μl)	20μl	3×20μl

注：5×Quick Ligation Buffer 在低温条件下，有可能析出沉淀，50°C加热5min沉淀可完全溶解，振荡混匀后使用，不影响连接效果。

保存：-20°C至少保存1年。

■ 产品简介

许多高温DNA聚合酶，如Taq DNA聚合酶、Tth DNA聚合酶等扩增的PCR产物在3'末端后都带有一个突出的碱基"A"，这样的PCR产物可以用3'末端后带有一个突出碱基"T"的载体方便地进行克隆。pBLUE-T 载体来源于pBlueScript II SK(+) 质粒，在EcoRI酶切位点处添加了适当序列，经Xcm I 酶切后其3'末端直接产生未配对的"T"碱基而成，因此有更高的重组效率。pBLUE-T 载体插入位点两端独特设计的两个EcoR I位点使插入片段可以用廉价高效的EcoR I单酶切检测；同时pBLUE-T载体不含NdeI或NcoI限制性内切酶位点，可方便用于克隆含上述酶切位点的基因。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 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。

■ 操作步骤

※ 目的片段连接

1. 插入片的准备：“A”粘末端PCR产物或者酶切后带“A”粘末端片段

1) 纯度：推荐使用琼脂糖凝胶电泳切胶纯化回收目的片段（建议长波紫外光下切胶或者可见光透射切胶，避免DNA损伤造成连接失败）。本公司的小量琼脂糖凝胶 DNA回收试剂盒或小量DNA产物纯化试剂盒可以对70bp以上的DNA片段有很好地回收效果。

2) 在通常状况下，没有必要对插入片段进行精确定量，一般载体与插入片段的摩尔比优化至1:1~1:10 就可以得到良好结果。推荐载体与片段摩尔比控制在1:3~1:7之间。

10μl连接体系下，需要加入插入片段的总量与浓度粗略估算如下：

插入片段大小 (bp)	推荐用量 (ng)	片段纯化后浓度(ng/μl)
100-1000	10-50	>5
1000-2000	50-100	>10
2000-5000	100-200	>15

2. 连接反应: (10 μ l反应体系)

1) 反应按以下体系进行:

5 \times Quick Ligation Buffer	2 μ l
pBLUE-T载体	1 μ l
纯化后的粘末端DNA片段/或者1 μ l 877bp control	X μ l
T4 DNA Ligase (5 Weiss Units/ μ l)	1 μ l
灭菌水	补足至10 μ l
Final Volume	10 μ l

注: 为使用方便, 可将T4 DNA Ligase和5 \times Quick Ligation Buffer按1:2比例混合均匀后使用, -20 $^{\circ}$ C保存, 可耐受至少60次的反复冻融。

加完试剂后, 用10 μ l移液器反复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。

注: 如果使用5 μ l体系连接, 各成分按照比例减半使用, 使用次数可以加倍。

2) 20~30 $^{\circ}$ C室温连接5-10分钟。

注: 推荐22 $^{\circ}$ C连接5-10分钟, >3kb长片段连接可以延长至30分钟。不要超过60分钟, 超过可能降低转化子数量。有条件可在PCR仪中完成。

3) 连接产物可直接转化感受态细胞或贮存于-20 $^{\circ}$ C。

注: 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。

※ 连接子转化与筛选

1. 转化: (具体请按所购买感受态说明书操作)

1) 加入4—5 μ l 连接液 (感受态细胞应刚从-70 $^{\circ}$ C冰箱取出放于冰浴上, 待刚刚解冻时加入连接产物, 连接产物的加入量不得超过感受态细胞体积的1/10), 轻轻混匀, 冰上放置30分钟。

2) 42 $^{\circ}$ C水浴热激60秒, 冰上放置2~3分钟, 其间不能摇动离心管。

3) 加250-500 μ l LB或者SOC培养基(不含抗生素), 37 $^{\circ}$ C 180rpm振荡培养30-60分钟。

4) 将150-250 μ l 细菌涂布在氨苄青霉素(100 μ g/ml)含IPTG/X-gal的平板上。待平板表面干燥后, 倒置平板, 37 $^{\circ}$ C培养16-20h过夜。(为得到较多克隆, 4000rpm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。)

2. 筛选:

(1) 转化子的蓝白筛选:

当外源DNA片段插入到pBLUE-T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。

(2) 转化子的鉴定:

1) 常规检测: 将得到的菌落接种1-5 ml LB (含有终浓度为100μg/ml的氨苄青霉素) 培养基, 37°C摇床振荡培养过夜, 保存菌种后提取质粒, 应用PCR 或酶切方法鉴定插入片段是否正确。

2) 快速检测: 挑取菌落直接进行PCR 检测 (可参见分子克隆第3 版本)。

①挑取白色单克隆至10μl无菌水中, 混匀。

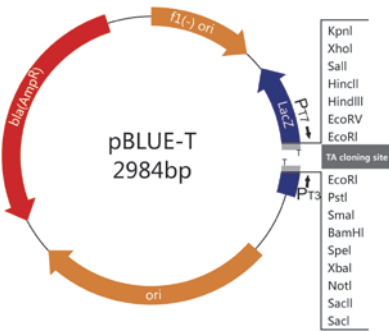
②取1μl混合于20μl 菌落PCR MasterMix体系中进行阳性克隆鉴定。

菌落PCR反应体系与反应条件

94°C	5min	菌落模板	1μl
94°C	15s	} 30 cycles	20μl
55°C	20s		
72°C	x min*		
72°C	5-10min	*根据片段大小确定延伸时间。扩增能力4kb/min。	

3) 测序鉴定: 使用通用M13、T7启动子引物测序来确定是否含有目的克隆。

■ pBLUE-T载体图谱



■ pBLUE-T载体测序引物序列

M13F: TGTA AACGACGCGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

注1: “M13通用引物”有多种不同的序列, 且个别引物合成公司默认的M13引物与此载体所用的M13序列有差异, 合成使用前务必先核对序列。

注2: 个别常用酶切位点说明

Sca I 2546

注3: 载体全序列请详见公司官网

■ pBLUE-T载体多克隆位点序列

