

pBLUE-T 载体连接试剂盒

pBLUE-T Vector Ligation Kit

使用说明书

货号: CV204

试剂盒组成:

试剂盒组成	20 次 (CV204-01)	60 次 (CV204-02)	20 次 (CV204-11)	60 次 (CV204-12)
pBLUE-T Vector(30ng/μL)	20μL	60μL	20μL	60μL
1000bp Control(30ng/μL)	5μL	5μL	5μL	5μL
10× PEG Enhancer	50μL	150μL	50μL	150μL
10 x Ligation Buffer	-	-	40μL	120μL
2× Quick Ligation Buffer	-	-	100μL	300μL
T4 DNA ligase(5U/μL)	-	-	20μL	60μL

产品储存: -20°C 储存, 6 个月内不影响使用效果。

产品介绍:

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。

测序可以采用 T3、T7 启动子引物和 M13 通用测序引物(见后面图谱)。

操作步骤:

1. 连接反应的准备:

1) 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。

2) 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 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. 常规连接反应:

1) 在一个标准的 10μL 连接反应体系中, 加入 1μL 30ng pBLUE-T 载体、X μL PCR 产物(在通常状况下, 没有必要对 PCR 产物进行精确定量, 一般 PCR 产物与载体的摩尔比优化至 2:1~10:1 就可以得到良好结果, 推荐 3:1)、1μL 10×ligation Buffer 和 0.5-1μL(2.5-5 Weiss Units)的 T4 DNA Ligase, 其余用水补足。反应按以下体系进行:

Components	Volume
10× Ligation Buffer (用前充分融解混匀)	1μL
10× PEG Enhancer	1μL
pBLUE-T Vector	1μL
纯化后的 PCR 产物/或者 1μL 1000bp control	X μL
无菌水	Y μL
T4 DNA Ligase	0.5-1μL (5 Weiss Units/μL)
Final Volume	10μL

注：一般最后加入T4 DNA Ligase。

2) 16°C连接过夜(一般可在PCR仪器完成)。

注：通常推荐16°C连接过夜(10μL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(10μL体系推荐连接酶量为5 Weiss Units)16°C连接30分钟即可达一般研究的要求。

3) 冰上冷却，然后转化或贮存于-20°C。

3. 快速连接反应：

1) 反应按以下体系进行：

Components	Volume
2× Quick Ligation Buffer (用前充分融解混匀)	5μL
pBLUE-T Vector	1μL
纯化后的 PCR 产物/或者 1μL 1000bp control	XμL
无菌水	YμL
T4 DNA Ligase	1μL (5 Weiss Units/μL)
Final Volume	10μL

注：一般最后加入T4 DNA Ligase。

2) 22°C连接5-10分钟(一般可在PCR仪器完成)。

注：2× Quick Ligation Buffer已经包含所有优化的快速连接成份，通常推荐22°C连接10分钟(10mL体系连接酶量为5 Weiss Units，长片段连接可以延长至30分钟)一般可以得到满意结果。此外本系统也可在16°C连接30分钟(10mL体系连接酶量为5 Weiss Units)即可达一般研究的要求。

3) 冰上冷却，然后转化或贮存于-20°C。

4. 转化：

1) 50-100μL感受态细胞，置于冰上，完全解冻后轻弹几次将细胞均匀悬浮。

2) 加入4—5μL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°C水浴热激90秒。冰上放置2~3分钟。

3) 加500μL LB或者SOC培养基(不含抗生素)，37°C 150 rpm振荡培养60分钟。

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

注：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度保存，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°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。

5. 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α-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°C培养过夜。

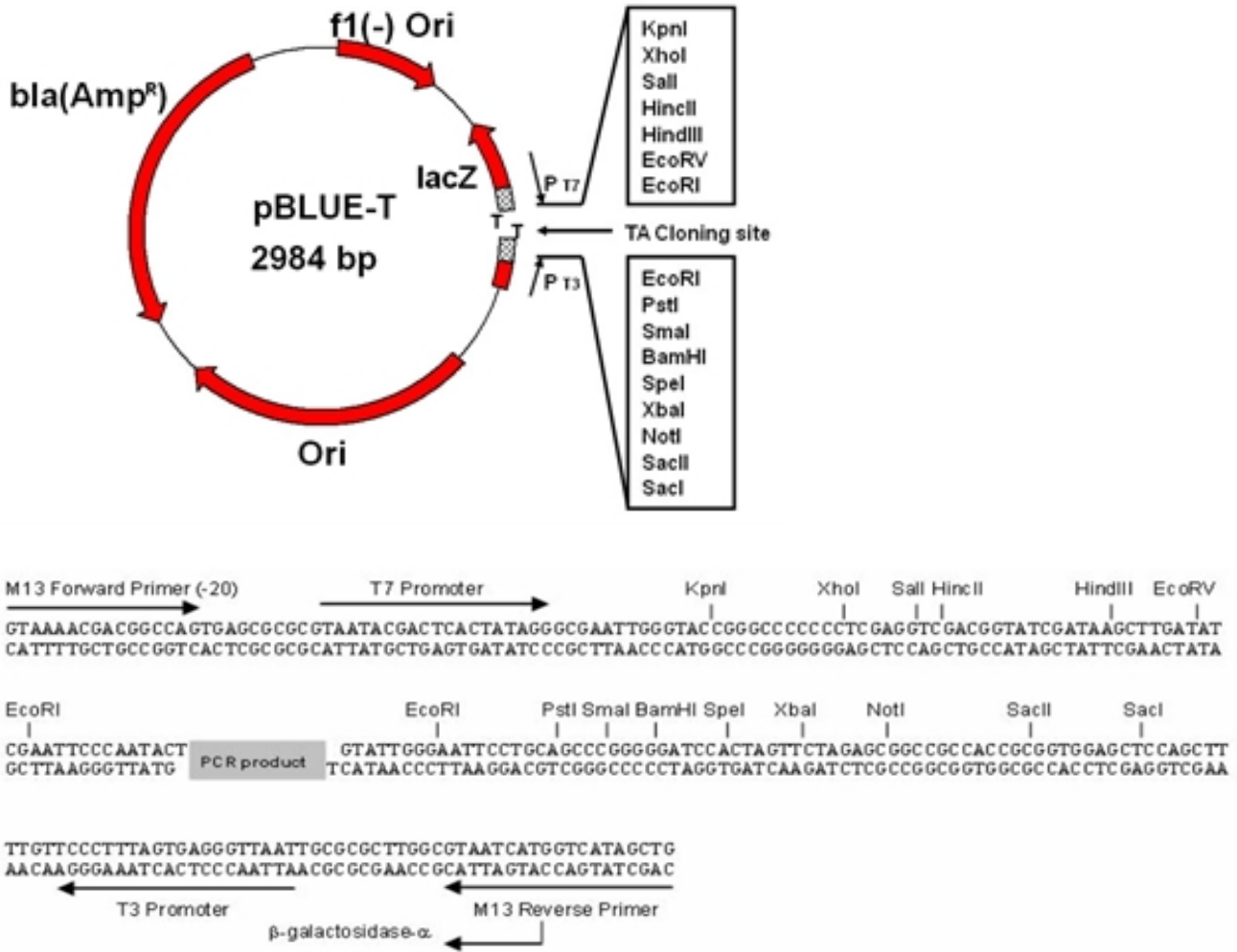
2) 转化子的鉴定：

a) 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。

b) 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)。

c) 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 载体图谱、启动子和多克隆位点序列：



如何计算连接反应中需要的 PCR 产物的量？

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÷2.984kb 载体]×3/1=40.2ng。

