

EZ-Blunt™ Blunt-end Cloning Vector EZ-Blunt™ 平末端克隆载体

货号: T170-101
保存条件: -20°C
运输条件: 低温

组分	试剂编号	体积
EZ-Blunt™ Cloning Vector (40 ng/μl)*	T170-101	20 μl
Control Insert for EZ-Blunt™ (40 ng/μl)	T170-102	5 μl

*满足至少 20 次克隆实验; 可耐受 10 次左右的反复冻融; 如每次用量少应按需分装。

【产品概述】

EZ-Blunt™ Cloning Vector 是高效、便利的平末端 PCR 产物克隆专用载体, 适用于与由 *Pfu*、*Pwo*、*Vent* 或 *KOD* 等高保真 DNA 聚合酶催化反应的 PCR 产物直接连接, 以利于下一步克隆或测序。本载体是基于 pBlueScript II SK(+) 质粒, 经 *EcoRV* 酶切、纯化等处理后获得的具有平末端碱基的线性载体, 不含 *NdeI* 或 *NcoI* 限制性内切酶位点, 故可用于克隆含上述酶切位点的基因。进行连接反应时, 可通过在反应液中添加少量 *EcoRV* 限制性内切酶以阻止载体自身环化, 提高插入片段的连接效率。严格按本说明书操作, 蓝斑率可低于 30%, 白斑含插入片段的阳性率可达 90% 以上。克隆含有 *EcoRV* 酶切位点的平端 PCR 产物时, 连接反应液中不可加入 *EcoRV*, 因此白斑率较低。DNA 测序建议使用 M13 Forward 和 M13 Reverse 或 T7 promoter 和 T3 promoter 通用型引物。

【EZ-Blunt™ 载体结构和序列】

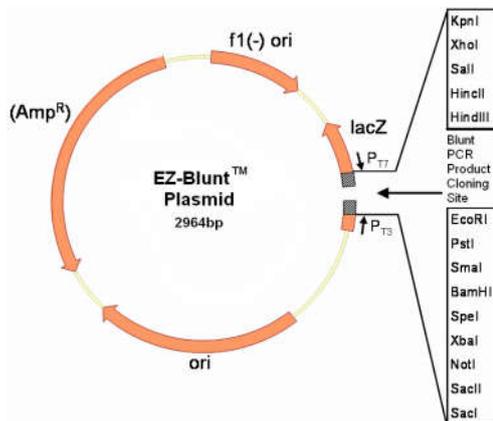


图 1. EZ-Blunt™ 载体环形图谱

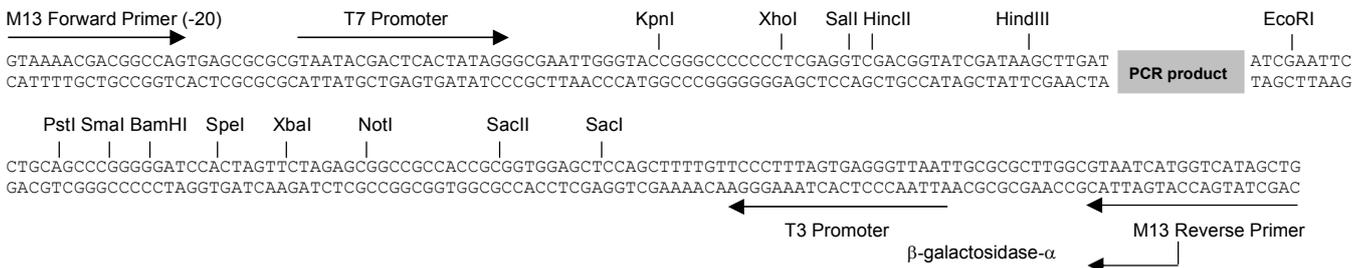


图 2. EZ-Blunt™ 载体的多克隆位点区序列及通用引物结合位点

【保存条件】

-20°C 恒温保存, 有效期一年

【质检标准】

插入 DNA 对照与 EZ-Blunt™ Cloning Vector 连接的摩尔比例为 3:1 时, 蓝斑率低于 30%, 有 90% 以上的白色菌落含插入 DNA

对照片段。经测序确认多克隆酶切位点及 PCR 产物存在。

【使用方法】

1. 平末端 PCR 产物的纯化和定量

- 1) 切胶回收纯化 PCR 产物。无非特异性产物的 PCR 产物可直接用于连接反应，但阳性率低于纯化的 PCR 产物。
- 2) 估算 PCR 产物的浓度，并按插入片段与 EZ-Blunt™ Cloning Vector 的摩尔比为 3~10:1 估算所需 PCR 产物的量。
插入片段体积(μl) = 载体量(ng) × 插入片段大小(kb) ÷ 载体大小(kb) × 插入片段与载体的摩尔比(3~10:1) ÷ 插入片段浓度(ng/μl)。
例：浓度为 20 ng/μl 的 500 bp PCR 插入片段应加体积为 40 ng × 0.5 kb ÷ 3 kb × 3 ÷ 20 ng/μl = 1 μl

2. 连接

- 1) 以使用普通 T4 DNA 连接酶为例，按下表配制连接反应液。

组分	样品	阳性对照
EZ-Blunt™ Cloning Vector (40 ng/μl)	1 μl	1 μl
Purified PCR Product	1-4 μl	-
Control Insert for EZ-Blunt™ (40 ng/μl)	-	1 μl
10 x Ligation Buffer	1 μl	1 μl
T4 DNA Ligase	0.5~1 μl	0.5~1 μl
EcoRV (10 U/μl)	0.1~0.5	0.1~0.5
Sterilized ddH ₂ O	定容至 10 μl	定容至 10 μl

*克隆含有 EcoRV 酶切位点的平端 PCR 产物时不可加入 EcoRV

- 2) 16°C 反应 1~16 小时 (建议反应 4 小时以上以确保连接效率)。
- 3) (可不作) 65°C 加热 15 分钟使连接酶失活。
注：连接反应液如不立即进行转化，可于 -20°C 长期保存。
3. 转化：以常规化学转化为例，具体方法请参考所使用感受态细胞的说明书
 - 1) 将感受态细胞置于冰上融解。
 - 2) 取 2~5 μl 连接反应液加入至 50 μl 感受态细胞中，冰中放置 10~30 分钟。
 - 3) 42°C 静置 45~60 秒。
 - 4) 冰中放置 2 分钟。
 - 5) 加入 800 μl SOC 或 LB 培养基，37°C 振荡培养 30~60 分钟，使 β-内酰胺酶基因表达。
 - 6) 将菌液均匀涂布到含 100 μg/ml 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 琼脂平板或含 X-gal、IPTG、Amp 的 LB 琼脂平板表面，37°C 培养 12~16 小时。
4. 鉴定
 - 1) 常规鉴定：挑取白色菌落提取质粒，应用电泳、PCR 或酶切等方法确定是否含目的片段。推荐使用我公司的 EZ-Lyse Rapid Colony Identification Kit (货号 T171)。
 - 2) 菌落 PCR：可选用 M13 Forward 和 M13 Reverse 或 T7 promoter 和 T3 promoter 通用型引物或基因特异性引物进行菌落 PCR。推荐建使用我公司的 2xTaq PCR StarMix (货号 A112) 或 EZ-PCR Rapid Colony Identification Kit (货号 T172)。
 - 3) DNA 测序：根据插入片段大小，选用图 2 所示的通用引物或基因特异性引物进行测序鉴定。

【补充说明】

1. PCR 产物最好经过切胶回收纯化，以提高克隆的阳性率。未纯化的 PCR 产物由于含有小片段 DNA、残留引物、引物二聚体等，克隆效率低于纯化的 PCR 产物，故鉴定时需多挑取一些菌落。
2. EZ-Blunt™ Cloning Vector 和 Control Insert for EZ-Blunt™ 应避免长时间放置于室温状态以及反复冻融，以免 DNA 降解。经检测，反复冻融 10 次左右对克隆效果无显著影响。若 EZ-Blunt™ 载体的单次用量小，应予分装。
3. 感受态细胞的选择：感受态细胞的转化效率应大于 10⁸ cfu/μg DNA。常规可用于蓝白斑筛选的菌株，如 DH5α、JM109、TOP10、XL1-blue 等，均可用于转化。使用普通 T4 DNA 连接酶，连接反应液可直接用于化学转化或电转化，但连接反应液体积不应超过感受态细胞的 10%。
4. 经验证明，600 bp 以下的插入片段在没有破坏读码框的情况下也会产生蓝色或淡蓝色的菌落。
5. 更多克隆相关技术资料请参考我公司网站 <http://www.gene-star.com> 或《康润生物产品目录》。

【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。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。