

天
净
沙
系
列

CAT#:60803A-50
CAT#:60803B-50
低温运输, -20℃保存



可保种型蓝白 T 载体 Blue-White Vector T

使用手册 V1.1

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>本产品(曾用名:一站式蓝白 T 载体)是环状的可以制备克必隆蓝白 T 载体的质粒 DNA。T 载体是克隆 PCR 扩增产物的必不可少的工具,但是由于市场上的各种 T 载体质量参差不齐,用户很难购买到满意的产品;同时购买的 T 载体为线性 DNA,不能保种,必须反复购买,累计成本很高。为解决这一问题,天泽基因特推出可保种型 T 载体,用户只需要购买 Xcm I 内切酶就可以自己制备高质量的 T 载体,随用随配,十分方便。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 一次购买,终身拥有。本产品提供制备 T 载体用的环形质粒 DNA,可以象其他质粒一样保种并长期保存。 2. 随用随配,十分方便。用户只需要提供 Xcm I 限制性内切酶和基本分子生物学实验条件,就可以自己制备 T 载体。整个过程只需要两天。 3. T 载体含 T 率为 100%。本方法不是使用传统的加尾法,而是使用 Xcm I 酶切法。质粒的多克隆位点上预先插入了一段长为 1.3 Kb 的 Xcm I DNA 片段,经 Xcm I 酶切后回收得到的质粒 DNA (T 载体) 两端自然全部带有 T 突出,比例远远高于用 Taq DNA 聚合酶加尾法和 TdT 加尾法得到的 T 载体。 4. 方便各种下游操作。用本产品得到的蓝白 T 载体插入位点两侧有多种常见的酶切位点,便于后续克隆; Xcm I 位点在 Alpha 互补区,可以使用蓝白斑筛选重组子;两边还有 T7 和 SP6 RNA 聚合酶启动子,便于制备 RNA 探针。 																							
<p>规格及成分</p>		<table border="1"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>A 型塑料袋包装</th> <th>B 型塑料袋包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>蓝白 T 载体(环状)</td> <td>60803a</td> <td>50 ng</td> <td>50 ng</td> </tr> <tr> <td>Xcm I (5U/uL)</td> <td>60803b</td> <td>无</td> <td>20 uL</td> </tr> <tr> <td>Xcm I Buffer, 10X</td> <td>60803c</td> <td>无</td> <td>0.3 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>60803sc</td> <td>1 份</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	A 型塑料袋包装	B 型塑料袋包装	蓝白 T 载体(环状)	60803a	50 ng	50 ng	Xcm I (5U/uL)	60803b	无	20 uL	Xcm I Buffer, 10X	60803c	无	0.3 mL	使用手册	60803sc	1 份	1 份		
成份	编号	A 型塑料袋包装	B 型塑料袋包装																					
蓝白 T 载体(环状)	60803a	50 ng	50 ng																					
Xcm I (5U/uL)	60803b	无	20 uL																					
Xcm I Buffer, 10X	60803c	无	0.3 mL																					
使用手册	60803sc	1 份	1 份																					
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输, -20℃保存, 有效期两年</p>																							
<p>自备试剂</p>	<p>连接反应试剂</p>																							

使用方法

一. 细菌的转化

1. 将100 μL 感受态细胞于冰上解冻。注意：最好使用 *end A1* 菌种（如DH1、DH5、DH5 α 、JM109、XL1-Blue等。常用宿主细菌的基因型可以参考《分子克隆手册》等参考书）。因为这类细菌所含DNase少，制备T载体后，残留的DNase对的T末端的破坏机会更小。
2. 取5-10 μL 本产品加入到感受态细胞中，轻轻旋转几次以混匀内容物。在冰上放置30分钟。
3. 将管放入预加温到42 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中，热休克90秒。快速将管转移到冰浴中，使细胞冷却1~2分钟。
4. 每管中加900 μL LB培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养1小时。
5. 取100 μL 培养液涂布到含Amp的LB琼脂平板表面。
6. 将平板置于室温直至液体被吸收。
7. 倒置平皿，于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养，12~16小时后可出现菌落。

二. 细菌的鉴定

1. 挑取单个菌落进行过夜细菌培养。
2. 按常规的方法进行质粒小量制备。
3. 用Xcm I内切酶按下面条件酶切提取的质粒DNA，如果大规模酶切，需要按比例增加各成分用量：

成分	使用量
Xcm I Buffer, 10X	5 μL
质粒DNA	<或= 2 μg
Xcm I	1 μL
超纯水	加到50 μL

37 $^{\circ}\text{C}$ 保温一小时，65 $^{\circ}\text{C}$ 保温20分钟使酶失活。

4. 电泳，本产品被Xcm I酶切后将产生3 Kb和1.3 Kb的两段DNA。
5. 如果Xcm I酶切图谱正确，则按常规的方法进行细菌的保种（详见分子克隆手册等参考书）。

三. T载体的制备

1. 参考《分子克隆手册》等参考书培养细菌和提取质粒DNA。注意：一定要去尽可能去除残留的RNA和蛋白质（含残留DNase）的污染。
2. 用Xcm I酶切质粒。注意：酶切时间最好不要超过一小时，避免残留的DNase对T末端的破坏。
3. 电泳后切下含3Kb DNA（既蓝白T载体）的胶段。注意：千万不要用UV

照射将要回收的片段，因为UV会使DNA交连，使DNA失去转化细菌的能力。如果酶切的DNA量大，可以使用天泽基因绿如蓝核酸染料，可以直接在可见光和黑背景下切胶。如果别无选择，最好在长波（360nm）紫外灯下快速切胶，尽可能切掉多余的凝胶。为避免DNA交连，可以使用天泽基因的DNA防护剂UV Erasol（CAT#: 60601）

4. 用常规DNA回收方法进行胶回收。
5. 测定T载体DNA的浓度后，将T载体DNA保存在-20℃备用或直接使用。

四. 连接反应

1. 短暂离心装有T载体的离心管。
2. 在两个离心管中加入下列成分：

成份	样品管	阴性对照管
T4 Ligase Buffer, 10X	1 uL	1 uL
蓝白 T 载体	20-50 ng	20-50 ng
PCR 纯化产物	50-500 ng	不加
T4 Ligase	3-5 U	3-5 U
补水到	10 uL	10 uL

注意: PCR纯化产物与蓝白T载体的摩尔比最好为3:1-10:1。

3. 用移液器吹打连接反应使之混匀后，16℃孵育12小时(或按T4 Ligase供货商提供的操作手册进行连接)。

五. 细菌转化和鉴定

1. 取5 μL连接产物进行转化，具体步骤见本手册一，最好使用含X-gal、IPTG、Amp的LB琼脂平板以便进行蓝白筛选。
2. 按经典的质粒提取+酶切或测序鉴定，可以选用的、在插入位点两侧都有酶切位点的酶有BstZ I、EcoR I和Not I。可以使用pUC/M13 Forward和Reverse测序引物测定插入片段的序列。按菌落PCR方法筛选，可选用天泽基因的菌落PCR试剂盒（CAT#: 50901）进行快速筛选，需要T7和SP6 RNA聚合酶启动子引物。

疑难解答

Q: 如何用T载体克隆平端PCR 产物

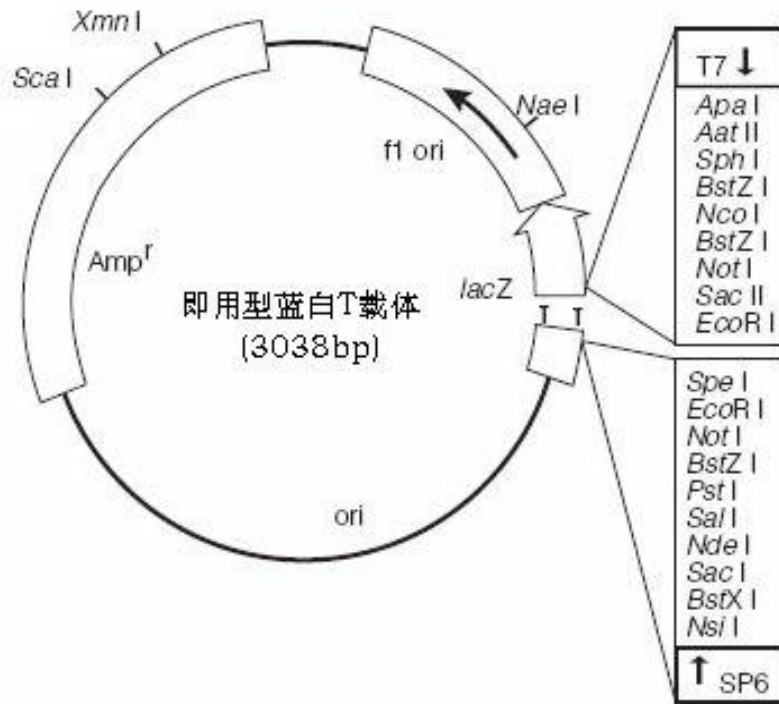
A: 具有校正活性的热稳定性 DNA 聚合酶（如 Pfu DNA 聚合酶，*Pwo* DNA 聚合酶，*Tli* DNA 聚合酶）得到的 PCR 产物为平端。这种平端 PCR 产物可以通过加 A 试剂盒（CTA#: 60105）加 A 后再克隆到 T 载体中，可得到 50-95%重组子。当然平端 PCR 产物也可以直接使用即用型克必隆 B 载体（CAT#: 51104）进行克隆。

	<p>Q: 如何根据 T 载体的用量计算 PCR 纯化片段的最佳用量?</p> <p>A: PCR纯化片段和载体的最佳摩尔比为3:1-10:1。根据T载体的用量,可以按下面的公式计算出连接反应中需要的PCR 纯化产物的用量:</p> $\frac{\text{加入载体的量(ng)} \times \text{插入片段大小(kb)}}{\text{载体大小(kb)}} \times \text{插入片段和载体的摩尔比} = \text{插入片段的量(ng)}$ <p>假如插入片段和载体的连接比例设定为3:1, 连接反应中加入蓝白T载体(长度为3 Kb)的量为50ng, 则需要长度为0.5 Kb 的PCR 纯化产物的量是:</p> $\frac{50 \text{ ng载体} \times 0.5 \text{ kb插入片段}}{3.0 \text{ kb载体}} \times 3/1 = 25 \text{ ng插入片段}$
--	---

蓝白T载体补充资料

质粒概况	<p>环状可保种型蓝白T载体质粒 (CAT#: 60803) 用Xcm I酶切后去除掉一段长为1350 bp的DNA插入片段后得到线状的即用型蓝白T载体 (CAT#: 60303), 前者的是长度为4388 bp, 后者的长度为3038 bp。不算1350 bp的DNA的插入片段, 它们主要位点的位置是:</p> <p>T位点: 48 (在可保种型蓝白T载体质粒中, 它以XcmI酶切位点形式存在)</p> <p>T7 RNA 聚合酶转录起始位点: 3015</p> <p>SP6 RNA聚合酶转录起始位点: 117</p> <p>多克隆位点: 3015-128</p> <p>lacZ 启动密码子: 180</p> <p>lac operator: 100-216</p> <p>β-lactamase 编码区: 1337-2197</p> <p>pUC/M13 Forward 测序引物结合位点: 2959-2975</p> <p>pUC/M13 Reverse测序引物结合位点: 176-192</p>
载体关系	可保种型蓝白T载体(环状) + Xcm I = 即用型蓝白T载体(线状) + 1.3 Kb插入片段

质粒图谱



克隆位点

可保种型蓝白T载体质粒DNA的克隆位点及其序列如下(粗体A表示1号碱基), 经过Xcm I用酶切后, 将要产生的3' 突出的T尾端用带方框的T表示, 位于48号碱基。

```

5'      AatII           BstZI           NotI           EcoRI
GGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTTCGATTAC
CCCGGGCTGCAGCGTACGAGGCGCGGTACCGCCGGCCCTTAAGCTAATG
3'              SphI              NcoI BstZI SacII

5'      Xcm I           将被切除的 1330 pb Xcm I 片段           Xcm I
CCAATTATCAATTGGNNNNNNN-----NNNNNNNNNNCAACAATAGTTGG
GTTAATAAGTTAACNNNNNNN-----NNNNNNNNNGTTGTTATCAACC
3'

5'      EcoRI BstZI PstI NdeI
TAGAATCACTAGTGAATTTCGCGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTC
ATCTTAGTGATCACTTAAGCGCCGCGGACGTCCAGCTGGTATAACCTCTCGAG
3'      SpeI              NotI              SalI              SacI
    
```

酶切位点

下列酶在克必隆蓝白T载体上有1-3个识别位点:

酶	位点数	位点	酶	位点数	位点
Aat II	1	3035	Acy I	2	1947, 3032
Acc I	1	91	Afl III	2	114, 517
AlwN I	1	933	Alw26 I	2	1471, 2247
Apa I	1	3029	Alw44 I	2	831, 2077
Bbu I	1	3	Ava II	2	1548, 1770
Bsa I	1	1471	BspH I	2	1237, 2245
BspM I	1	77	BssS I	2	690, 2074
BstX I	1	118	Drd I	2	625, 2559
Dra III	1	2604	Dsa I	2	14, 23
Hinc II	1	92	Eco R I	2	29, 70
Hind II	1	92	Fsp I	2	1632, 2855
Mlu I	1	114	Not I	2	20, 77
Nae I	1	2707	Nsp I	2	3, 521

Nco I	1	14	Pvu I	2	1780, 2876
Nde I	1	97	Pvu II	2	341, 2905
Nsi I	1	127	Sin I	2	1548, 1770
Pst I	1	88	Ssp I	2	2214, 2396
Rsa I	1	1890	Tfi I	2	352, 492
Sac I	1	109	Ban I	3	261, 1358, 2641
Sac II	1	26	Ban II	3	109, 2679, 3029
Sal I	1	90	BstZ I	3	8, 20, 77
Sca I	1	1890	Cfr10 I	2	1490, 2705
Spe I	1	64	Dra I	3	1276, 1295, 1987
Sph I	1	3	Eag I	3	8, 20, 77
Sty I	1	14	Ear I	3	401, 2205, 2893
Xmn I	1	2009	Vsp I	3	288, 347, 1582

下列酶在克必隆蓝白T载体上没有识别位点:

Acc III、Acc 65 I、AccB7 I、AflIII、AgeI、AscI、Ava I、AvrII、Ball、BamH I、BbeI、BbrPI、BbsI、BclI、BglII、BlpI、Bpu1102 I、Bsa、B I、Bsa、M I、Bsi、W I、Bsm I、Bsr、Br I、Bsr、G I、Bss、H II、Bst1107 I、Bst98 I、Bst、E II、Bsu36 I、ClaI、CspI、Csp45 I、DraII、Eco47 III、Eco、N I、Eco72 I、Eco81 I、EheI、FseI、Hind III、Hpa II-、PpoI、KasI、KpnI、NarI、Nhe I、Nru I、PacI、Pae、R7 I、PflM I、PinA I、PmeI、PmlI、PpuM I、PshA I、Psp5 II、PspA I、Rsr II、Sfi I、SgfI(i)、SgrA I、SmaI、SnaB I、Spl I、SrfI、StuI、Swal、Tth111 I、XbaI、XcmI、XhoI、XmaI

DNA 序列

下面的DNA序列是去除Xcm I酶切片段以后的载体部分，3' 突出的T用方框表示

```

1 ATGCTCCCGG CCGCCATGGC GGCCGCGGGA ATTCGATTAC CCAATTA $\square$  TA
51 GTTGGTAGGA ATCACTAGTG AATTCGCGGC CGCCTGCAGG TCGACCATAT
101 GGGAGAGCTC CCAACGCGTT GGATGCATAG CTTGAGTATT CTATAGTGTC
151 ACCTAAATAG CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT
201 TGTTATCCGC TCACAATTCC ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAGTG
251 TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC
301 GCTCACTGCC CGCTTTCCAG TCGGGAAACC TGTCGTGCCA GCTGCATTAA
351 TGAATCGGCC AACGCGCGGG GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GGCGCTCTTC
401 CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTGCTTCGG CTGCGGCGAG
451 CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG
501 GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA
551 CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG
601 ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA
651 GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC
701 TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT
751 CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG
801 GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA
851 GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG
901 TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC
951 AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA
1001 CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC
1051 CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC
1101 ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTCG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG
1151 AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTCTACG GGGTCTGACG
1201 CTCAGTGGA CGAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA
1251 AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC

```

1301	AATCTAAAGT	ATATATGAGT	AAACTTGGTC	TGACAGTTAC	CAATGCTTAA
1351	TCAGTGAGGC	ACCTATCTCA	GCGATCTGTC	TATTTTCGTTT	ATCCATAGTT
1401	GCCTGACTCC	CCGTCTGTGA	GATAACTACG	ATACGGGAGG	GCTTACCATC
1451	TGGCCCCAGT	GCTGCAATGA	TACCGCGAGA	CCCACGCTCA	CCGGCTCCAG
1501	ATTTATCAGC	AATAAACCAG	CCAGCCGGAA	GGGCCGAGCG	CAGAAGTGGT
1551	CCTGCAACTT	TATCCGCCTC	CATCCAGTCT	ATTAATTGTT	GCCGGGAAGC
1601	TAGAGTAAGT	AGTTCGCCAG	TTAATAGTTT	GCGCAACGTT	GTTGCCATTG
1651	CTACAGGCAT	CGTGGTGTCA	CGCTCGTCGT	TTGGTATGGC	TTCATTACAG
1701	TCCGGTTCCC	AACGATCAAG	GCGAGTTACA	TGATCCCCCA	TGTTGTGCAA
1751	AAAAGCGGTT	AGCTCCTTCG	GTCCTCCGAT	CGTTGTGAGA	AGTAAGTTGG
1801	CCGCAGTGTT	ATCACTCATG	GTTATGGCAG	CACTGCATAA	TTCTCTTACT
1851	GTCATGCCAT	CCGTAAGATG	CTTTTCTGTG	ACTGGTGAGT	ACTCAACCAA
1901	GTCATTCTGA	GAATAGTGTA	TGCGGCGACC	GAGTTGCTCT	TGCCCGGCGT
1951	CAATACGGGA	TAATACCGCG	CCACATAGCA	GAACTTTAAA	AGTGCTCATC
2001	ATTGGAAAAC	GTTCTTCGGG	GCGAAAACCTC	TCAAGGATCT	TACCGCTGTT
2051	GAGATCCAGT	TCGATGTAAC	CCACTCGTGC	ACCCAACCTGA	TCTTCAGCAT
2101	CTTTTACTTT	CACCAGCGTT	TCTGGGTGAG	CAAAAACAGG	AAGGCAAAAAT
2151	GCCGCAAAAA	AGGGAATAAG	GGCGACACGG	AAATGTTGAA	TACTCATACT
2201	CTTCCTTTTT	CAATATTATT	GAAGCATTTA	TCAGGGTTAT	TGTCTCATGA
2251	GCGGATACAT	ATTTGAATGT	ATTTAGAAAA	ATAAACAAAT	AGGGGTTCCG
2301	CGCACATTTT	CCCGAAAAGT	GCCACCTGAT	GCGGTGTGAA	ATACCGCACA
2351	GATGCGTAAG	GAGAAAATAC	CGCATCAGGA	AATTGTAAGC	GTTAATATTT
2401	TGTTAAAATT	CGCGTTAAAT	TTTTGTTAAA	TCAGCTCATT	TTTTAACCAA
2451	TAGGCCGAAA	TCGGCAAAAAT	CCCTTATAAA	TCAAAAAGAAT	AGACCGAGAT
2501	AGGGTTGAGT	GTTGTTCCAG	TTTGGAACAA	GAGTCCACTA	TTAAAGAACG
2551	TGGACTCCAA	CGTCAAAGGG	CGAAAAACCG	TCTATCAGGG	CGATGGCCCA
2601	CTACGTGAAC	CATCACCCCTA	ATCAAGTTTT	TTGGGGTCTGA	GGTGCCGTAA
2651	AGCACTAAAT	CGGAACCCTA	AAGGGAGCCC	CCGATTTAGA	GCTTGACGGG
2701	GAAAGCCGGC	GAACGTGGCG	AGAAAGGAAG	GGAAGAAAGC	GAAAGGAGCG
2751	GGCGCTAGGG	CGCTGGCAAG	TGTAGCGGTC	ACGCTGCGCG	TAACCACCAC
2801	ACCCGCCGCG	CTTAATGCGC	CGCTACAGGG	CGCGTCCATT	CGCCATTACG
2851	GCTGCGCAAC	TGTTGGGAAG	GGCGATCGGT	GCGGGCCTCT	TCGCTATTAC
2901	GCCAGCTGGC	GAAAGGGGGA	TGTGCTGCAA	GGCGATTAAG	TTGGGTAACG
2951	CCAGGGTTTT	CCCAGTCACG	ACGTTGTAAA	ACGACGGCCA	GTGAATTGTA
3001	ATACGACTCA	CTATAGGGCG	AATTGGGCC	GACGTCGC	
