

克
必
隆
系
列

CAT#:60603-20
低温运输、-20℃保存

TIANDZ

即用型蓝白 T 载体

Instant Blue-White T Vector

使用手册 V1.0

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>本产品是用Xcm I酶切环状的可保种型蓝白T载体(CAT#:60803)去掉一段1.3Kb的插入片段后得到的线性DNA片段(载体部分),其两个末端的5' 都有一个突出的T,可以用于快速克隆具有加尾活性的耐热酶(如Taq DNA聚合酶)扩增得到的PCR片段。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 由于是通过Xcm I酶切制备,所以载体两端的带T率为100%,远高于用Taq DNA聚合酶和TdT末端转移酶在平末端载体加尾得到的T载体。 2. 克隆的阳性率一般在90%以上,缩短了筛选过程。 3. 插入位点两侧有对称的常见酶切位点(如EcoR I),便于对克隆的PCR片段进行近一步的分析。 4. 克隆位点两侧分别有T7和T3 RNA聚合酶启动子,便于用克隆的PCR片段制备RNA探针。 5. 可以使用pUC/M13 Forward和Reverse测序引物测定插入片段的序列。 6. T克隆位点位于β-半乳糖苷酶的α-肽编码区内,可以进行蓝白斑筛选。 7. 含有丝状噬菌体f1 复制起始子,可以制备单链DNA。 												
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成 份</th> <th>编 号</th> <th>20 次塑料袋包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>即用型蓝白 T 载体(40ng/uL)</td> <td>60603A</td> <td>20 uL</td> </tr> <tr> <td>阳性对照(40ng/uL)</td> <td>60603B</td> <td>5 uL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>60603sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>	成 份	编 号	20 次塑料袋包装	即用型蓝白 T 载体(40ng/uL)	60603A	20 uL	阳性对照(40ng/uL)	60603B	5 uL	使用手册	60603sc	1 份
成 份	编 号	20 次塑料袋包装											
即用型蓝白 T 载体(40ng/uL)	60603A	20 uL											
阳性对照(40ng/uL)	60603B	5 uL											
使用手册	60603sc	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, 超纯水</p>												
<p>使用方法</p>	<p>一. PCR产物的纯化和定量</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分离。最好不要使用TBE缓冲液,因为它会影响DNA的胶回收效率。 2. 在长波(360nm)紫外灯下快速切胶,尽可能切掉多余的凝胶。为避免嘧啶二聚体的形成,可以使用天泽基因的DNA防护剂UV Erasol (CAT#: 60601)。 3. 用天泽基因的柱式DNABACK (CAT#:60202) 纯化回收PCR片段。溶解PCR片段的超纯水体积越小越便于后续操作。 4. 将回收的片段与浓度已知的DNA Marker在含EB (CAT#:3180) 或绿如蓝染料 (CAT#:70303) 的琼脂糖凝胶中电泳,通过比较DNA条带的荧光强度而估测PCR纯化产物的浓度。注意:一般不推荐使用测OD260的方法,因为回收的DNA很珍贵,该方法需要比较多的DNA。 												

5. 如果所得的DNA片段浓度较低，可以使用本公司核酸浓缩剂（CAT#: 110801）将其浓缩到需要的浓度。
6. 如果PCR片段为平末端，则需要用加A试剂盒处理，否则不能用于与T载体的连接反应。

二. 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	负对照	正对照
自备 T4 Ligase Buffer, 10×	1 uL	1 uL	1 uL
蓝白 T 载体(40 ng/uL)	1 uL	1 uL	1 uL
自备 PCR 纯化产物	(见下注)	不加	不加
阳性对照(40 ng/uL)	不加	不加	1 uL
自备 T4 Ligase(5-10 U/uL)	1 uL	1 uL	1 uL
补超纯水到	10 uL	10 uL	10 uL

注: PCR纯化产物与蓝白T载体的摩尔比最好为3-10，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ng数:

$$\frac{\text{加入载体的量}(ng) \times \text{插入片段大小}(kb)}{\text{载体大小}(kb)} \times \text{插入片段和载体摩尔比}$$

假如插入片段和载体的连接比例设定为3，连接反应中加入蓝白T载体(长度为3 Kb)的量为40ng，则需要长度为0.5 Kb 的PCR 纯化产物的量是:

$$\frac{40 \text{ ng载体} \times 0.5 \text{ kb插入片段}}{3.0 \text{ kb载体}} \times 3 = 20 \text{ ng插入片段}$$

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)。

三. 细菌转化

1. 将100 μL感受态细胞于冰上解冻。注意：最好使用转化效率在 1×10^8 cfu/μg DNA以上的感受态细胞进行转化，因为采用单碱基突出端进行连接不是很有效。
2. 取5 μL连接产物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℃的水浴中，热休克90秒。快速将管转移到冰浴中，