



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ **pBLUE -T 载体连接试剂盒**
 - ◆ 目录号 **CV04**
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

pBLUE-T 载体连接试剂盒

目录号: CV04

试剂盒组成、储存、稳定性:

组成	20 次 (CV0401)	60 次 (CV0402)	20 次 (CV0403)	60 次 (CV0404)
pBLUE-T vector (30ng/ μ l)	20 μ l	60 μ l	20 μ l	60 μ l
1000bp Control (30ng/ μ l)	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
10 \times PEG Enhancer	50 μ l	150 μ l	50 μ l	150 μ l
2 \times Quick Ligation Buffer			100 μ l	300 μ l
10 \times Ligation Buffer			40 μ l	120 μ l
T4 DNA ligase, 5U/ μ l			100U	300U

储存: -20°C 保存, 载体反复冻融至少 10 次不影响使用质量。

❖ 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。



❖ **操作步骤:**

1. **连接反应的准备:**

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。

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。Taq酶和Pfu、Pwo、Tli或Deep vent 等具有3'→5' 外切酶活性的DNA聚合酶混合扩增的产物末端可能带有3' -A。具有3' -A末端的PCR产物可以直接用pBLUE-T Easy 载体进行克隆连接。具有3'→5' 外切酶活性的DNA聚合酶扩增的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 10 μl 连接反应体系中，加入 1 μl 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)、1 μl 10×ligation Buffer 和 0.5-1 μl (2.5 -5 Weiss Units)的 T4 DNA Ligase，其余用水补足。反应按以下体系进行:

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

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）。

通常推荐 16°C连接过夜（10µl 体系标准连接酶量为 2.5 Weiss Units），可以得到最多的转化子。虽然本系统在 16°C连接 1 小时（10µl 体系推荐连接酶量为 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。

3. 快速连接反应:

- 1). 反应按以下体系进行:

5µl	2 × Quick Ligation Buffer
1µl	pBLUE-T 载体
Xµl	纯化后的 PCR 产物/或者 1µl 1000bp control
Yµl	无菌水
1µl (5 Weiss Units/µl)	T4 DNA Ligase
Final Volume	10µl

一般最后加入 **T4 DNA Ligase**。

- 2). 16°C连接 30 分钟（一般可在 PCR 仪器完成）。

2 × Quick Ligation Buffer 已经包含所有优化的快速连接成份，通常推荐 16°C连接 30 分钟（10µl 体系标准连接酶量为 5 Weiss Units，长片段连接可以延长至 2 小时）一般可以得到满意结果。此外本系统在室温（22-25°C）连接 5-10 分钟（10µl 体系推荐连接酶量为 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:

- 100µl 感受态细胞，置于冰上，完全解冻后轻掸几次将细胞均匀悬浮。
- 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。

-
- 4). 加 500 μ l LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素), 37 $^{\circ}$ C 150 rpm 振荡培养 60 分钟。
- 5). 将 200 μ l 细菌涂布在预先用 16 μ l 50mg/ml IPTG 和 40 μ l 20 mg/ml X-gal 涂布的氨苄青霉素平板上。

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, 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。

- 6). 平板在 37 $^{\circ}$ 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 分钟室温快速转化

- 1). 100 μ l 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—5 μ l 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。室温放置 5 分钟。
- 3). 加 500 μ l LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素), 37 $^{\circ}$ C 150 rpm 振荡培养 60 分钟。
- 4). 按照正常转化步骤继续进行。

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 $^{\circ}$ 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

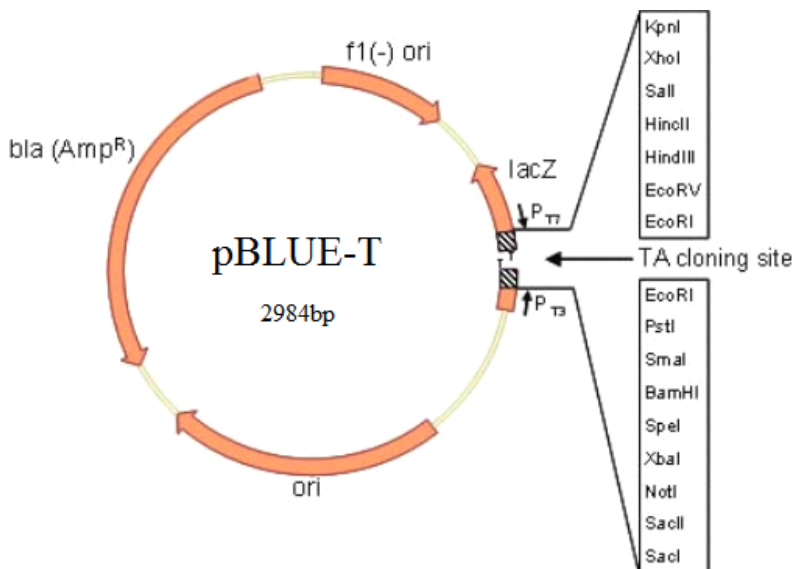
切，琼脂糖凝胶电泳检查片段大小，确定是否含有目的片段。

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）

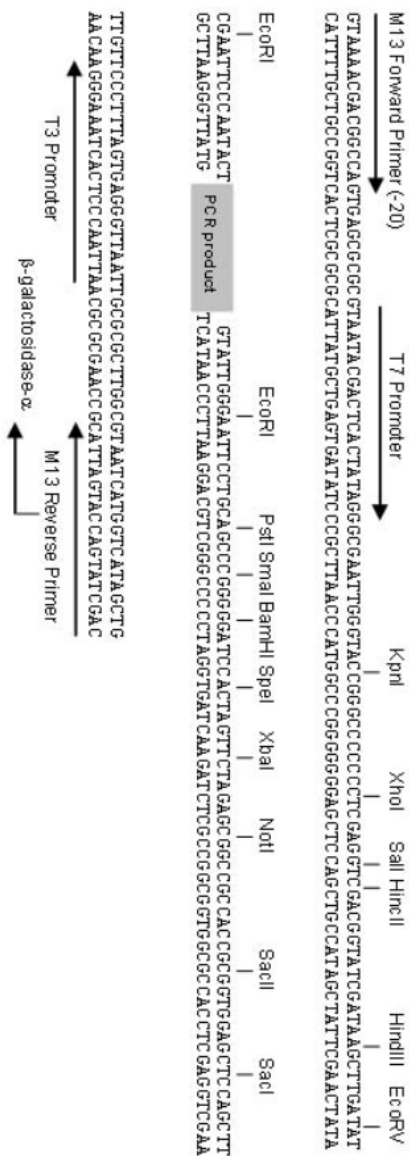
c. 用T3和T7启动子引物或其它合适的引物测序来确定是否含有目的克隆。

❖ 附录：

⇒ pBLUE-T 载体图谱：



⇒ pBLUE-T 载体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5:1, 如连接反应中加入载体30ng, 插入片段大小为500bp, 这时应加入插入片段的量为[30ng载体 × 0.5kb插入片段 ÷ 2.984kb载体] × 5/1=25ng。

