天净沙系列

CAT#: 1-S221236

低温运输，-20℃保存

天净沙

即用型蓝白 T 载体 1 型（T7 启动子，有 MCS）

Ready-to-use Blue-White T Vector Type 1 (T7 promoter, with MCS)

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

即用型蓝白 T 载体是一种高效克隆 PCR 产物（TA Cloning）的专用载体。它具有下列特点：

1. 本载体由 pUC 载体酶切而得，载体的 3’端带悬挂的“T”末端。
2. 可以直接用于 AT 克隆。
3. 可以对转化子进行蓝白斑筛选。
4. 载体上有测序引物结合位点，可以用 M13 通用引物对重组质粒进行测序。
5. 载体上有 T7 启动子，可以对克隆的 DNA 直接进行体外转录。

规格及成分

本产品使用 logo 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
即用型蓝白 T 载体 1 型 (T7 启动子，有 MCS)	221236	20 T	0.5 mL 本色瓶
使用手册	1-S221236sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂

连接反应试剂、SOC 培养基、IPTG、X-gal、LB 培养基等。

使用方法

一. 实验准备

1. PCR 产物 3’末端带有突出的 A 碱基：Taq、Tth、AmpliTaq、KlenTaqDNA 聚合酶扩增的 PCR 产物 3’末端均带有突出的 A 碱基。建议扩增的 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行回收，再进行连接转化实验。
2. PCR 产物 3’末端没有突出的 A 碱基：Pfu、Pwo、Tli 或 DeepVent 等 DNA 聚合酶具有 3’5’外切酶活性，其扩增的 PCR 产物末端可能不带有 3’A，要对这种平末端 PCR 产物进行克隆，应先对其进行 3’末端加 A，再进行连接转化实验。

二. 连接反应

1. 在一个标准的 10 μL 连接反应体系中，加入下列成分：

反应组分	**10 μL 反应体系**
插入的 DNA 目的片段	x μL（0.2 pmol）
即用型蓝白 T 载体，50ng/μL	1 μL（50 ng）
10×连接酶缓冲液	1 μL
T4 DNA 连接酶	3-5 U
补水到	10 L

注意：一般最后加入 T4DNA 连接酶。

2. 用移液器吹打反应混合液使之混匀后，16-23℃连接 1~12 小时（或按 T4 DNA

	连接酶供货商提供的操作手册进行连接）。 **三．细菌转化和鉴定** 1. 将 100 μL 自备的大肠杆菌感受态细胞置于冰上解冻后，完全解冻后轻轻将细胞均匀悬浮。 2. 加入上述 5 μL 连接液，轻轻混匀，冰上放置 30 分钟。 3. 42℃水浴热激 90 秒，再冰上放置 15~20 分钟。 4. 加入 400 μL 自备的 SOC 培养基，37℃ 200～250×g 振荡培养 1 小时。 5. 4000×g 离心 5 分钟，用枪头吸掉 400 μL 上清液，用剩余的培养基将细胞悬浮。 6. 将细菌悬液均匀涂布在含 20 μL 的 IPTG（100 mM）和 100 μL 的 X-gal（20 mg/mL）的氨苄青霉素抗性的自备的 LB 平板上。（涂布菌液的用量可以根据连接的效率及感受态细胞的转化效率而进行适当的调整。） 7. 将平板于 37℃培养 1 小时，然后倒置培养过夜。（先将平板正向放置 1 小时，以吸收过多的液体）。 **四．转化子的蓝白筛选和鉴定** 8. 当外源 DNA 片段插入到 T 载体中后，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。 9. 选择在 IPTG/X-gal 平板上生长的白色菌落，用牙签挑至含氨苄青霉素的液体培养基，37℃培养过夜。 10. 用上述培养的白色菌落的菌液抽提质粒，用 PstI 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。 11. 用 M13 通用引物或其它合适的引物直接进行测序来确定是否含有目的克隆。
关联产品	T4 DNA 连接酶