

## Zero pFAST-Blunt Cloning Kit 零背景 pFAST-Blunt 克隆试剂盒

货号：DT123-01

规格：20 次

保存：-20 °C

### 【产品简介】

本产品利用Topoisomerase 原理可以在瞬间完成连接的优良特性，结合特有的工艺制成。与传统T4连接酶原理不同，可以不用冰浴和热休克，室温5min 内完成连接，37°C 复苏10min即可涂板，全过程只需15-20min；无自连、零背景，无需蓝白斑筛选，长至10kb 的片段亦可高效连接，阳性克隆率近100%。是一款操作简单、快速、零背景的平台克隆载体。

**提示：测序只能采用 M13F/M13R通用引物测序（见后面图谱），但是不能采用M13(-47)/M13(-48)通用引物测序。菌落PCR可使用和测序相同的引物。**

### 【产品组分】

试剂盒组成	20 次(DT123-01)	100 次(DT123-05)
pFAST-Blunt Vector(30 ng/μl)	20 μl	100 μl
1 Kb Control (40 ng/μl)	5 μl	5 μl
10 × Enhancer	20 μl	100 μl

### 【保存条件】

-20°C恒温保存，有效期一年。

### 【操作步骤】

#### 1. PCR 产物制备：

- PCR引物不能磷酸化。
- 使用产物是平末端的高保真聚合酶系列扩增。
- 仅有目的条带、无非特异条带和引物二聚体的PCR产物可直接进行连接反应，无需纯化，否则建议胶回收纯化。如果以质粒为模板的PCR产物则建议进行纯化。

#### 2. 连接反应：

(1) 室温（25°C-35°C）按照如下体系操作（10μl 体系）：

纯化后的 PCR 产物/或者 1μl 1kb control	0.5-5μl
pFAST-Blunt Vector	1μl
10 × Enhancer	1μl
ddH <sub>2</sub> O	Up to 10 μl

所有组分加完后，用移液器轻轻吹打混匀或者轻弹管底混匀，低速瞬时离心后室温（25°C-35°C）连接反应 5 min。长片段或者连接困难片段可以延长连接时间到 10-15 分钟，温度可选 37°C，可显著增加转化子数量。

**注：此步骤在室温进行，不可置于冰上，否则会降低连接效率。**

不同大小插入片段的推荐用量：

插入片段大小 (bp)	最佳用量 (ng)
100-1000	10-40
1000-2000	40-80
2000-5000	80-150

(2) 连接产物可直接转化感受态细胞或贮存于-20 °C。

如尚未准备好感受态细胞，可以将连接产物短时间置于冰上备用。

### 3. 转化:

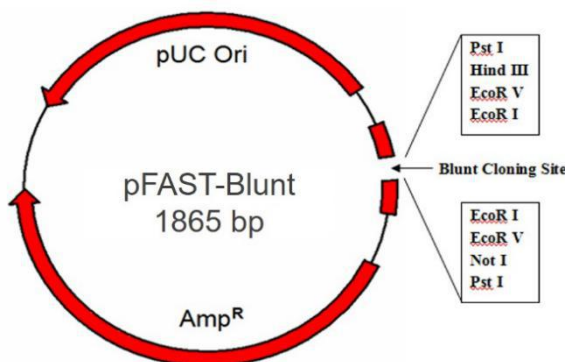
- (1) 50-100  $\mu$ l 感受态细胞, 置于室温解冻, 完全解冻后(约 1min 左右)轻弹几次将细胞均匀悬浮。
- (2) 加入 5  $\mu$ l 连接液(最多可全部加入, 但体积不要超过感受态细胞体积的 1/10), 轻轻混匀, 冰上放置 5min。42 $^{\circ}$ C 水浴热休克 60 秒, 冰上放置 2-3 分钟。
- (3) 加 300-500  $\mu$ l 平衡至室温的 LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素), 37 $^{\circ}$ C 180 rpm 振荡培养 10min。若感受态细胞转化效率低或者插入片段大于 2 Kb, 可以增加复苏时间至 30-60min 以得到更多的转化子。
- (4) 取 100-200  $\mu$ l 菌液涂板(含氨苄青霉素 100  $\mu$ g/ml), 过夜培养。

### 4. 转化子的筛选鉴定:

本产品阳性率极高, 一般所见即所得, 在无杂菌污染及转化子数量不算太少的情况下, 所长菌落基本为包含插入片段的阳性克隆。因此插入片段不超过 2-3 Kb 时, 无需鉴定, 直接挑菌测序。

- (1) 酶切法鉴定: 用上述培养的白色菌落的菌液抽提质粒, 插入片段较大的情况下, 直接跑电泳看质粒大小就能鉴定出有插入的质粒, 还可用 EcoR I/EcoR V 单酶切释放插入片段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。
- (2) PCR 法鉴定: 挑取菌落直接进行 PCR 检测。
- (3) 测序法: 使用通用 M13F/M13R 引物测序来确定是否含有目的克隆。**注意测序引物不能采用 M13(-47)/M13(-48)通用引物测序。**

### ❖ pFAST-Blunt 载体图谱:



### ❖ pFAST-Blunt 载体通用测序引物序列:

M13F: TGTA AACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

### ❖ pFAST-Blunt 载体多克隆位点序列:



### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 承诺为您更换等量合格产品, 本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。