

M5 pZERO-Blunt Simple Kit 零背景 平末端快速连接试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 pZERO-Blunt Simple Kit	20T	MF132-01
M5 pZERO-Blunt Simple Kit	4x20T	MF132-04

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 12 个月。

【产品简介】

零背景平末端快速连接试剂盒是一种先进的自杀基因阳性选择克隆系统，可以高效克隆平末端 PCR 产物和任何具有平末端的 DNA 片段。该试剂盒对磷酸化或非磷酸化的 DNA 片段都有效。阳性选择载体和插入片段连接仅需 5 分钟即可获得超过 90% 的阳性重组克隆。由具有校正活性的聚合酶（如：X5, Q5, Phusion, KOD 等）扩增的平末端 PCR 产物可直接连入克隆载体。连接产物可直接转化常用的大肠杆菌菌株。

本试剂盒提供一个新颖的自杀基因阳性选择克隆载体 pZERO-Blunt Simple。该载体含有致死的自杀基因，当载体与片段连接成功，自杀基因无法正确表达，包含重组子的细胞可以正常生长；当载体与片段连接不成功，载体自连后自杀基因正确表达，包含自连空载体的细胞无法存活，即“零 ZERO”背景。这种阳性筛选策略无需蓝白斑筛选，极大地加速了克隆筛选进程。

pZERO-Blunt Simple 消除了插入位点附近的多克隆酶切位点，需要在 PCR 扩增引物上导入合适的酶切位点。此时如果使用 PCR 扩增引物导入的酶切位点进行 DNA 酶切时，酶切反应将不会受到 T 载体上其它多克隆酶切位点上的限制酶影响，可以大大提高酶切效率，增加亚克隆成功率。

【产品组分】

组分名称	20 T	4x20 T
pZERO-Blunt Simple Vector (40ng/μl)	20 μl	80 μl
1K bp Control (40ng/μl)	5 μl	5 μl
T4 DNA Ligase, 5U/μl	20μl	80 μl
2x Quick Ligation Buffer	100μl	400μl
pZERO-Blunt Simple Forward Sequencing Primer (10μM)	100μl	400μl
pZERO-Blunt Simple Reverse Sequencing Primer (10μM)	100μl	400μl

【操作步骤】

1. 连接反应的准备：

平末端PCR产物或者酶切后平末端片段可以通过琼脂糖凝胶电泳分离回收（使用长波紫外光下切胶或者可见光透射切胶避免DNA损伤造成连接失败）。与载体的摩尔比是 3:1。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。

2. 快速连接反应：

- 1) 在一个标准的 10 μl 连接反应体系中，加入 1 μl 40ng pZERO-Blunt Simple 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 1:1~10:1 就可以得到良好结果，推荐 3:1，见附录)、5μl 2 × Quick ligation Buffer 和 0.9μl 的 T4 DNA Ligase，其余用灭菌水补足。

反应按以下体系进行：

2 × Quick Ligation Buffer	5μl
pZERO-Blunt Simple 载体	1μl
纯化后的 PCR 产物/或者 1μl 1000bp control	Xμl
灭菌水	Yμl
T4 DNA Ligase	0.9μl (5 Weiss Units/μl)
Final Volume	10μl

一般最后加入 T4 DNA Ligase。

- 2) 22°C连接 5-10 分钟（一般可在 PCR 仪器完成）。
- 3) **通常推荐 22°C连接 5-10 分钟， >3kb 长片段连接可以延长至 30 分钟。不推荐超过 30 分钟，超过可能降低转化子数量。**
- 4) 冰上冷却，然后转化或贮存于-20°C。

3. 转化：

- 1) 100μl 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—5μl 连接液(最多可全部加入，只要连接液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。
- 3) 42°C水浴热激 90 秒。冰上放置 2~3 分钟。
- 4) 加 500μl LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素)，37°C 150 rpm 振荡培养 60 分钟。
- 5) 将 200μl 细菌涂布在氨苄青霉素(100μg/ml)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，如果 预计的克隆较少，可通过离心（4,000rpm，2 分钟）后吸除部分培养液，留下适量的培养基悬浮菌体后取全部或者适量涂布于一个平板中（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°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。

4 筛选：

- 1). 常规检测：将得到的菌落接种 1-5 ml LB（含有终浓度为 100μg/ml 的氨苄青霉素）培养基，37°C摇床振荡培养过夜，保存菌种后提取质粒，应用 PCR 或酶切方法鉴定插入片段是否正确。
- 2). 快速检测：挑取菌落直接进行 PCR 检测（可参见分子克隆第 3 版本或者参考本公司 CV05-通用 T 载体菌落 PCR 鉴定试剂盒说明书）。
- 3). 测序鉴定：使用**试剂盒自带引物**或者 **T7 启动子引物**测序确定是否含有目的克隆。

本试剂盒自带测序引物（也用于菌落 PCR 鉴定引物）：

Forward sequencing primer, 23-mer	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGTC- 3'
Reverse sequencing primer, 24-mer	5'-AAGAACATCGCTTTTCGATGGCAG- 3'

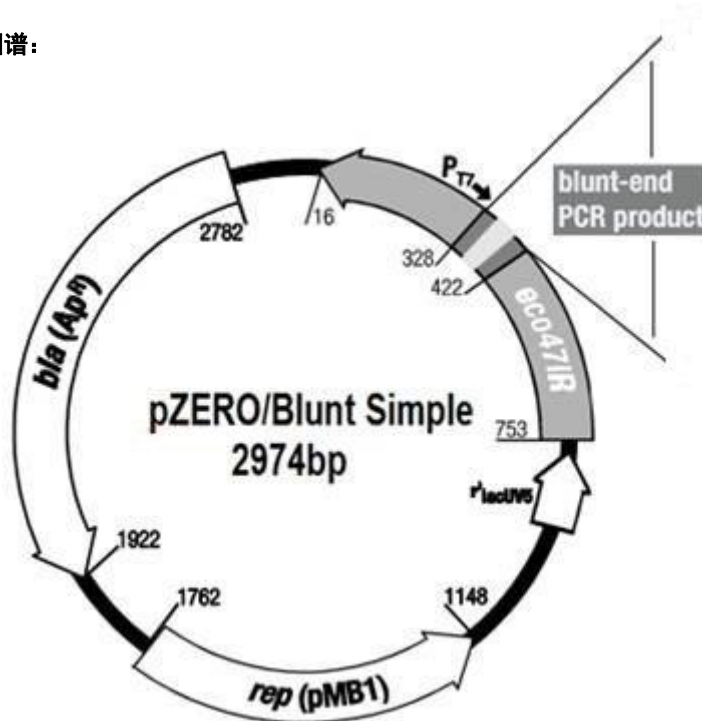
❖ 附录：

⇒ 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1:1~10:1（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3:1，如连接反应中加入载体40ng，插入片段大小为500bp，这时应加入插入片段的量为[40ng载体×0.5kb插入片段÷2.974kb载体]×3/1=20.2ng。

⇒ pZERO-Blunt Simple 载体图谱:



⇒ pZERO-Blunt Simple 载体克隆位点序列:

forward sequencing primer, 23-mer		→	
T7 promoter		T7 transcription start	
5'	GGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA	GCG TCC GCC GGA TCT CCC GGA TG	
3'	CCG CAT TAT GCT GAG TGA TAT CCC TCT	CGC AGG CGG CCT AGA GGG CCT AC	
	Ala Tyr Tyr Ser Glu Ser Tyr Pro Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ser Pro		
G TTC GAG TTT TTC AGC AAG AT		blunt-end	A TCT CTC TAG CAG GTC TCC
C	AAG CTC AAA AAG TCG TTC TA	PCR product	T AGA GAG ATC GTC CAG AGG
	Glu Leu Lys Glu Ala Leu		Arg Glu Leu Leu Asp Gly
TAC AAT ATT CTC AGC TGC CAT CGA AAA GCG ATG		TTC TTC T	3'
ATG	TTA TAA GAG TCG ACG GTA GCT TTT CGC TAC	AAG AAG A	5'
	Val Ile Asn Glu Ala Ala Met Ser Phe Arg His Glu Glu		
←		reverse sequencing primer, 24-mer	

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。