

版本号: VT131113

## ZeroBack Fast Ligation Kit

### 零背景快速连接试剂盒

目录号: VT204

#### 产品内容

产品组成	VT204-01 (20 $\mu$ l)	VT204-03 (10 $\mu$ l)
pZeroBack/Blunt Vector (25 ng/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l
T4 DNA Ligase (5 U/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l
2 $\times$ Reaction Buffer	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
DNA Blunting Enzyme	10 $\mu$ l	5 $\mu$ l
pZeroBack/Blunt Forward Sequencing Primer (10 $\mu$ M)	200 $\mu$ l	100 $\mu$ l
pZeroBack/Blunt Reverse Sequencing Primer (10 $\mu$ M)	200 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Control Insert DNA (700 bp, 50 ng/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml

#### 保存条件

请将试剂盒置于-20 $^{\circ}$ C保存, 避免反复冻融。

---

## 产品简介

零背景快速连接试剂盒是一种阳性选择克隆系统，可以高效克隆各种PCR产物和任何具有平末端或粘性末端的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 min即可获得超过95%的阳性重组克隆。由具有校正活性的聚合酶（如：Pfu Polymerase）扩增的平末端PCR产物可直接连入克隆载体。由无校正活性的聚合酶（如：Taq Polymerase）或聚合酶混合物扩增的PCR产物在连接前需用试剂盒提供的热稳定DNA平端化酶进行末端平端化（5 min）即可。连接产物可直接转化常用的大肠杆菌菌株。

试剂盒提供一个新颖的即用型阳性选择克隆载体pZeroBack/Blunt Vector。该载体含有致死的限制酶基因（内含多克隆位点），多克隆位点插入外源片段会引起酶基因失活，因此只有转化了重组质粒的细菌才能存活形成克隆菌落。而自身环化的pZeroBack/Blunt Vector表达致死的限制酶（无外源片段插入），转化后杀死大肠杆菌细胞。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。

## 不同片段使用量

1. 载体与片段的摩尔比控制在1:3-1:10，对于1kb以下的片段建议使用1:3的比例，1kb以上的片段建议使用1:7的比例。当使用粘末端片段进行连接时，如果片段浓度过低，平端化酶会对载体造成一定的损伤，增加产生假阳性的风险。

2. 请根据凝胶电泳或紫外分光光度计检测后的浓度和片段长度来计算其摩尔比。插入片段用量，可根据以下公式粗略计算：

$$\text{插入片段用量 ng} = (3 \sim 10) \times \frac{\text{插入片段长度}}{\text{载体长度}} \times \text{载体用量 ng}$$

连接体系中25ng的载体，不同大小的PCR产物最佳加入量举例如下：

PCR产物长度 (bp)	最佳的使用量 (ng)
700 bp	18 ng
2000 bp	120 ng

---

## 使用方法（以下的步骤请在无菌条件下操作）

### 一、平末端连接方法：

- 用于高保真耐热DNA聚合酶产生的具有平末端的PCR产物的克隆。
- 若由其他耐热聚合酶产生的粘性末端的PCR产物进行克隆时，请先进行平端化，详见粘末端连接步骤。
- 本方法也适用于由限制性内切酶产生的平末端的DNA片段，连接前DNA片段应使用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收，载体与片段的摩尔比是1:3。

#### 1. 按照下表的内容在无菌的离心管中加入各种成分

组成成分	体积
目的PCR片段	X $\mu$ l
pZeroBack/Blunt Vector (25 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
2× Reaction Buffer	5 $\mu$ l
T4 DNA Ligase (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	补足至10 $\mu$ l

轻轻弹动离心管以混匀反应液，短暂离心3-5 sec。

- #### 2. 将混合反应液放置室温（22℃）反应5 min。反应结束后，将离心管置于冰上，进行后续的转化反应。

注意：如果插入片段长度大于3 kb，可以将反应时间最大延长至30 min。

### 二、粘性末端连接方法：

- 用于Taq DNA Polymerase或含有Taq DNA Polymerase的混合酶产生的3'端带A的PCR产物的克隆。
- 如果PCR产物末端的结构不明确，请使用粘性末端连接方法。
- 本方法也适用于由限制性内切酶产生的5'或3'带有突出端的DNA片段，连接前DNA片段应使用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收，载体与片段的摩尔比是1:3。

1. 按照下表的内容在无菌的离心管中加入各种成分，进行平端化反应。

组成成分	体积
Insert DNA	X $\mu$ l
2 $\times$ Reaction Buffer	5 $\mu$ l
DNA Blunting Enzyme	0.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	补足至8.5 $\mu$ l

轻轻弹动离心管以混匀反应液，短暂离心3-5 sec。

2. 将混合反应液置于70 $^{\circ}$ C反应5 min，放在冰上短暂冷却。
3. 向平端化的反应体系中加入下列成分

组成成分	体积
pZeroBack/Blunt Vector (25 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
T4 DNA Ligase (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l

4. 将混合反应液置于室温(22 $^{\circ}$ C)反应5 min。反应结束后，将离心管置于冰上，进行后续的转化反应。

**注意：如果插入片段长度大于3 kb，可以将反应时间最大延长至30 min。**

## 对照实验

实验方法同粘性末端连接。

1. 按照下表的内容在无菌的离心管中加入各种成分，进行平端化反应。

组成成分	体积
Control Insert DNA (700 bp, 50 ng/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
2 $\times$ Reaction Buffer	5 $\mu$ l
DNA Blunting Enzyme	0.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	补足至8.5 $\mu$ l

轻轻弹动离心管以混匀内容物，短暂离心3-5 sec。

2. 将混合反应液置于70 $^{\circ}$ C反应5 min，放在冰上短暂冷却。
3. 向平端化的反应体系中加入下列成分

---

组成成分	体积
pZeroBack/Blunt Vector (25 ng/μl)	1 μl
T4 DNA Ligase (5 U/μl)	0.5 μl

轻轻弹动离心管以混匀反应液，短暂离心3-5 sec。

4. 将混合反应液置于室温（22℃）反应5 min。反应结束后，将离心管置于冰上，进行后续的转化反应。

## 转化

1. 制备含有氨苄青霉素终浓度100 μg/ml的LB琼脂糖平板。将平板放置在37℃，至少预热20 min。
2. 转化
  - a. 取部分连接产物加到50-100 μl TOP10感受态细胞中（感受态细胞应刚从-70℃冰箱取出放于冰浴上，待刚刚解冻时加入连接产物，连接产物的加入量不超过感受态细胞体积的十分之一），轻弹混匀，冰浴30 min（必要时请使用超螺旋质粒pUC19同步转化感受态细胞作为对照检测转化效率，将0.1 ng pUC19加入另一只感受态细胞管中，其余的操作步骤与连接产物的转化步骤同步进行）。
  - b. 将离心管置于42℃恒温90 sec，取出管后立即置于冰浴中放置2-3 min，其间不要摇动离心管。
  - c. 向离心管中加入250-500 μl 37℃预热的LB（不含抗生素）培养基，150 rpm、37℃振荡培养45 min。目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达，使菌体复苏。
  - d. 将离心管中的菌液混匀，吸取100 μl加到含氨苄青霉素的LB固体琼脂培养基上，用无菌的弯头玻棒轻轻的将细胞均匀涂开。待平板表面干燥后，倒置平板，37℃培养12-16 h。

## 检测

1. 常规检测：将得到的菌落接种1-5 ml LB（含有终浓度为100 μg/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。

Control Insert DNA的PCR鉴定，请参考以下反应条件：

95°C 2 min  
94°C 30 sec  
60°C 20 sec  
72°C 30 sec  
72°C 5 min  
4°C ∞

30 cycles

2. 快速检测：挑取菌落直接进行PCR检测（具体方法见分子克隆第三版）。
3. 测序鉴定：使用常规或快速方法进行初步的鉴定后进行序列的测定。

## 注意事项

1. 转化过程中使用对照片段做对照是非常必要的，在实验出现问题时可以确定原因。
2. 建议留下部分连接产物，在出现问题后能迅速的补救，减少不必要的重复实验。
3. 涂布用量可根据具体实验作相应调整。如转化的DNA总量较多，可取更少量转化产物涂布平板；反之，如转化的DNA总量较少，可取200-300 μl转化产物涂布平板。如果预计的克隆较少，可通过离心（4000 rpm，2 min）后吸除部分培养液，留下适量的培养基悬浮菌体后将其涂布于一个平板中（涂布剩余的菌液可置于4°C保存，如果次日的转化菌落数过少可以将剩下的菌液再涂布新的培养板）。

## pZeroBack/Blunt Vector测序引物

pZeroBack/Blunt Forward Sequencing Primer, 23-mer	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'
pZeroBack/Blunt Reverse Sequencing Primer, 24-mer	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

## pZeroBack/Blunt Vector图谱



