
版本号:130124

Zero Blunt Quick Ligation Kit
pZERO-Blunt 零背景平末端快速连接试剂盒

目录号: CV08

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	20 次(CV0801)	40 次(CV0802)
pZERO-Blunt Vector(40ng/μl)	20 μl	40 μl
900bp Control (40ng/μl)	5 μl	5 μl
2 × Quick Ligation Buffer	100 μl	200 μl
T4 DNA ligase, 5U/μl	20 μl	40 μl
pZERO-Blunt Forward Sequencing Primer (10μM)	50 μl	100 μl
pZERO-Blunt Reverse Sequencing Primer (10μM)	50 μl	100 μl

-20℃ 储存, 6 个月内不影响使用效果。

❖ 产品介绍:

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 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。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自杀基因阳性选择克隆载体 pZERO-Blunt。该载体含有致死的自杀基因 (内含多克隆位点), 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。

为方便酶切作图和插入片段基因操作，pZERO-Blunt 克隆载体的多克隆位点两侧各包含一个 BglIII 识别序列。此外，该载体含有 T7 启动子，可用于体内或体外转录、插入片段测序等研究。

❖ 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 μ l 连接反应体系中，加入 1 μ l 40ng pZERO-Blunt 载体、X μ l 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)、5 μ l 2 \times Quick ligation Buffer 和 0.9 μ l 的 T4 DNA Ligase，其余用灭菌水补足。

反应按以下体系进行:

5 μ l	2 \times Quick Ligation Buffer
1 μ l	pZERO-Blunt 载体
X μ l	纯化后的 PCR 产物/或者 1 μ l 900bp control
Y μ l	灭菌水
0.9 μ l (5 Weiss Units/ μ l)	T4 DNA Ligase
<hr/>	
Final Volume	10 μ l

一般最后加入 **T4 DNA Ligase**。

- 2) 22 $^{\circ}$ C 连接 5-10 分钟（一般可在 PCR 仪器完成）。
通常推荐 22 $^{\circ}$ 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。
- 3) 冰上冷却，然后转化或贮存于-20 $^{\circ}$ C。

3. 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。

5 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**测序来确定是否含有目的克隆。

本试剂盒自带测序引物 (暨菌落 PCR 引物):

forward sequencing primer, 23-mer	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'
reverse sequencing primer, 24-mer	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-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。

