



Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

版本号:2020-07-21

零背景ZT4-Blunt(Kan⁺)快速克隆试剂盒

Zero Background ZT4-Blunt(Kan⁺) Fast Cloning Kit

(目录号: ZC209) 含多克隆酶切位点

· 快速 · 简捷 · 高效 · 稳定性高

- 可5min快速连接, 且克隆效率超过95%
- 无需IPTG及X-Gal进行蓝白斑筛选
- PCR扩增产物无需磷酸化
- 酶切产物无需去磷酸化
- 专用于平滑末端DNA片段或PCR扩增产物
- 特别适合Pfu、KOD等系列产物的克隆

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

■ 产品组成

试剂盒组成	ZC209-1(20次)	ZC209-2(60次)
ZT4-Blunt(Kan ^r) Vector (25ng/μl)	20μl	3×20μl
5 × Quick Ligation Buffer	40μl	3×40μl
T4 DNA Ligase (5 Weiss Units/μl)	20μl	3×20μl
877bp Control Insert (50ng/μl)	5μl	5μl
1×菌落PCR MasterMix (ZT4-Blunt引物)	1ml	3×1ml
ZT4 Reverse Primer	100μl	300μl

注：*1: 5×Quick Ligation Buffer 在低温条件下，有可能析出沉淀，50°C加热5min沉淀可完全溶解，振荡混匀后使用，不影响连接效果。

*2: 由于暂时无法克服的引物设计原因，载体mix个别情况下会出现800bp左右的假阳性扩增；如目的片段在700-900bp之间，使用1×菌落PCR MasterMix (ZT4-Blunt引物) 鉴定后，务必使用目的片段特异引物再次鉴定阳性后送测序；或者直接使用目的片段特异引物鉴定。

保存：-20°C至少保存1年。

■ 产品简介

零背景ZT4-Blunt(Kan^r)克隆试剂盒是专门对平滑末端DNA片段或PCR扩增产物进行高效克隆的一种阳性筛选系统。该克隆载体包含一个致死基因，当目的DNA片段插入克隆位点时，该致死基因被破坏，故仅带插入目的片段的克隆才能生长形成白色菌落，无需加入IPTG及X-Gal进行蓝白斑筛选，克隆阳性率超过95%。

■ 操作步骤

※ 目的片段连接

1. 插入片段的准备：平末端PCR产物或者酶切后平末端片段

1) 纯度：推荐使用琼脂糖凝胶电泳切胶纯化回收目的片段（建议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）。本公司的小量琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒或小量DNA产物纯化试剂盒可以对70bp以上的DNA片段有很好地回收效果。

2) 总量与浓度：在通常状况下，没有必要对插入片段进行精确定量，一般载体与插入片段的摩尔比优化至1:1~1:10 就可以得到良好结果。推荐载体与片段摩尔比控制在1:3~1:7之间。

10μl 连接体系下，需要加入插入片段的总量与浓度粗略估算如下：

插入片段大小 (bp)	推荐用量 (ng)	片段纯化后浓度 (ng/μl)
100-1000	10-50	>5
1000-2000	50-100	>10
2000-5000	100-200	>15

2. 连接反应: (10 μ l反应体系)

1) 反应按以下体系进行:

5 \times Quick Ligation Buffer	2 μ l
ZT4-Blunt(Kan ^r)载体	1 μ l
纯化后的平端DNA片段/或者1 μ l 877bp control	X μ l
T4 DNA Ligase (5 Weiss Units/ μ l)	1 μ l
灭菌水	补足至10 μ l
Final Volume	10 μ l

注: 为使用方便, 可将T4 DNA Ligase和5 \times Quick Ligation Buffer按1:2比例混合均匀后使用, -20 $^{\circ}$ C保存, 可耐受至少60次的反复冻融。

加完试剂后, 用10 μ l 移液器反复吹打混匀或者轻弹管底混匀, 低速瞬时离心收集所有液体在离心管底。

注: 如果使用5 μ l 体系连接, 各成分按照比例减半使用, 使用次数可以加倍。

2) 20~30 $^{\circ}$ C室温连接5-10分钟。

注: 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。不要超过30分钟, 超过可能降低转化子数量。有条件可在PCR仪中完成。

3) 连接产物可直接转化感受态细胞或贮存于-20 $^{\circ}$ C。

注: 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。

※ 连接子转化与筛选

1. 转化: (具体请按所购买感受态说明书操作)

1) 加入4—5 μ l 连接液 (感受态细胞应刚从-70 $^{\circ}$ C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得超过感受态细胞体积的1/10), 轻轻混匀, 冰上放置30分钟。

2) 42 $^{\circ}$ C水浴热激60秒, 冰上放置2~3分钟, 其间不能摇动离心管。

3) 加250-500 μ l LB或者SOC培养基(不含抗生素), 37 $^{\circ}$ C 180rpm振荡培养30-60分钟。

4) 将150-250 μ l 细菌涂布在硫酸卡那霉素(50 μ g/ml)平板上。待平板表面干燥后, 倒置平板, 37 $^{\circ}$ C培养12-16h过夜。(为得到较多克隆, 4000rpm离心1分钟, 弃掉部分上清, 保留100-150 μ l, 轻弹悬浮菌体, 取全部菌液涂板, 培养过夜。)

2. 筛选:

转化子的筛选鉴定:

本制品阳性率相当高, 一般情况下, 可以达到所见即所得, 只要是长出来的菌落正常(不是污染的杂菌, 转化子数量也不算太少), 基本就包含插入。因此插入片段不超过3kb的情况下可以不用鉴定直接挑1-2个菌去测序。

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）。

①挑取白色单克隆至10μl无菌水中，混匀。

②取1μl混合于20μl 菌落PCR MasterMix体系中进行阳性克隆鉴定。

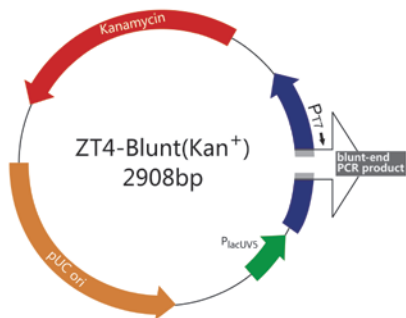
菌落PCR反应体系与反应条件

94°C	5min	} 30 cycles	菌落模板	1μl
94°C	15s		菌落PCR MasterMix(ZT4-Blunt引物)	20μl
55°C	20s			
72°C	x min*			
72°C	5-10min		*根据片段大小确定延伸时间。扩增能力4kb/min。	

3) 测序鉴定：①正向：使用通用T7启动子引物测序。

②反向：使用试剂盒自带ZT4 Reverse Primer引物测序。

■ ZT4-Blunt(Kan⁺)载体图谱



■ ZT4-Blunt(Kan⁺)载体测序引物序列

T7 Forward Sequencing Primer, 20-mer:
5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'

RSP Reverse Sequencing Primer, 24-mer:
5' -AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

■ ZT4-Blunt(Kan⁺)载体多克隆位点序列

T7 forward sequencing primer, 20-mer →															Eco52I NotI		BglII		Kpn2I		XhoI PspXI							
5'	GCC	GTA	ATA	CGA	CTC	ACT	ATA	GGG	AGA	GCG	GCC	GCC	AGA	TCT	TCC	GGA	TGG	CTC	GAG	TTT	TTC	AGC	AAG					
3'	CCG	CAT	TAT	GCT	GAG	TGA	TAT	CCC	TCT	CGC	CGG	CGG	TCT	AGA	AGG	CCT	ACC	GAG	CTC	AAA	AAG	TCG	TTC					
AT	blunt-end PCR product		A	TCT	TTC	TAG	AAG	ATC	TCC	TAC	AAT	ATT	CTC	AGC	TGC	CAT	GGA	AAA	TCG	ATG	TTC	TTC	T	3'				
TA	T	AGA	AAG	ATC	TTC	TAG	AGG	ATG	TTA	TAA	GAG	TCG	ACG	TGC	ACG	GTA	CCT	TTT	AGC	TAC	AAG	AAG	A	5'				
															XbaI		BglII		BglI		Bsu15I							
																							← RSP reverse sequencing primer, 24-mer					

■ 注意事项（载体全序列请详见公司官网）

个别常用酶切位点说明：PstI 9、HindIII 624、EcoRV 2023