



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

版本号:2018-07-09

# 零背景ZT4-Blunt(Kan<sup>+</sup>)快速克隆试剂盒

## Zero Background ZT4-Blunt(Kan<sup>+</sup>) 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<sub>1</sub>、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 <sup>+</sup> ) 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
菌落PCR MasterMix (ZT4-Blunt引物)	1ml	3×1ml
ZT4 Reverse Primer	100μl	300μl

注：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。

保存：-20°C至少保存1年。

## ■ 产品简介

零背景ZT4-Blunt(Kan<sup>+</sup>)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 $\mu$ l反应体系)

1) 反应按以下体系进行:

5 $\times$ Quick Ligation Buffer	2 $\mu$ l
ZT4-Blunt(Kan <sup>r</sup> )载体	1 $\mu$ l
纯化后的平端DNA片段/或者1 $\mu$ l 877bp control	X $\mu$ l
T4 DNA Ligase (5 Weiss Units/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
灭菌水	补足至10 $\mu$ l
Final Volume	10 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ l 细菌涂布在氨苄青霉素(100 $\mu$ 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 $\mu$ 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。

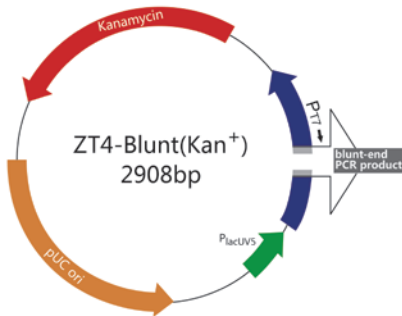
**菌落PCR反应体系与反应条件**

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<sup>+</sup>)载体图谱**



**■ ZT4-Blunt(Kan<sup>+</sup>)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<sup>+</sup>)载体多克隆位点序列**

