

Code No. 3275

研究用

TaKaRa

pBackZero-T Vector
Cloning Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 纯 度	1
● 用 途	1
● pBackZero-T Vector 的结构	2
● 实验操作	2
■ Control DNA 片段的克隆实验	2
■ 一般 DNA 片段的克隆实验	3
● 相关说明	3
● 使用注意	4
● Q&A	5

● 制品说明

pBackZero-T Vector是一种阳性克隆率非常高而背景很低的PCR产物克隆（TA Cloning）专用载体。本载体是由pUC19载体改建而成，它消除了pUC19载体上的*LacZ*基因及多克隆位点，并对β-lactamase（*bla*）基因进行了特别的改造，再通过酶切反应，最后在两侧的3'端添加“T”而成。因大部分耐热性DNA聚合酶进行PCR反应时都有在PCR产物的3'末端添加一个“A”的特性，所以使用本制品可以大大提高PCR产物的连接、克隆效率。

本载体对β-lactamase基因进行了特别的改造，使用时需在待插入的DNA片段的上、下游Primer的5'端加上TTTAA 5个碱基。如果需要定向克隆，只需在一条引物的5'端加上TTTAA 5个碱基，这样可以保障β-lactamase基因具有活性，菌落可以在Amp抗性平板上生长。而那些由于载体自连、插入非目的片段等原因造成的假阳性克隆不具有β-lactamase基因活性，不能在Amp抗性平板（工作浓度100 μg/ml）上生长。因此使用这种载体在Amp抗性平板上生长的菌落基本都是阳性克隆，背景降至很低，保证了非常高的阳性克隆率。使用本试剂盒中的Control Insert 4时，阳性克隆率可以达到99%以上。此外，本载体也无需使用IPTG/X-Gal进行蓝白筛选。值得注意的是由于本载体上消除了多克隆酶切位点，当PCR产物使用本载体进行克隆时，将无法使用载体上的限制酶切位点，需要事先在PCR扩增引物上导入合适的酶切位点。本制品中的高效连接液Solution I可以在短时间内（约30分钟）完成连接反应，其连接液可以直接用于细菌转化，大大方便了实验操作。本制品中的Control Insert 4（500 bp）可以用于Control反应。

● 制品内容（20次量）

1. pBackZero-T Vector (50 ng/μl)	20 μl × 1支
2. Control Insert 4 (50 ng/μl)	10 μl × 1支
3. Solution I*1	75 μl × 2支
4. Primer <i>Bla</i> M1 (20 μM) *2	50 μl × 1支
5. Primer <i>Bla</i> RV (20 μM) *2	50 μl × 1支

*1: 使用时请于冰中融解。

*2: Primer *Bla* M1: 5' - AAG CCC TCC CGT ATC GTA GTT ATC -3' (24 nt)

Primer *Bla* RV: 5' - ACT CAC GTT AAG GGA TTT TGG TCA -3' (24 nt)

● 保存: -20℃

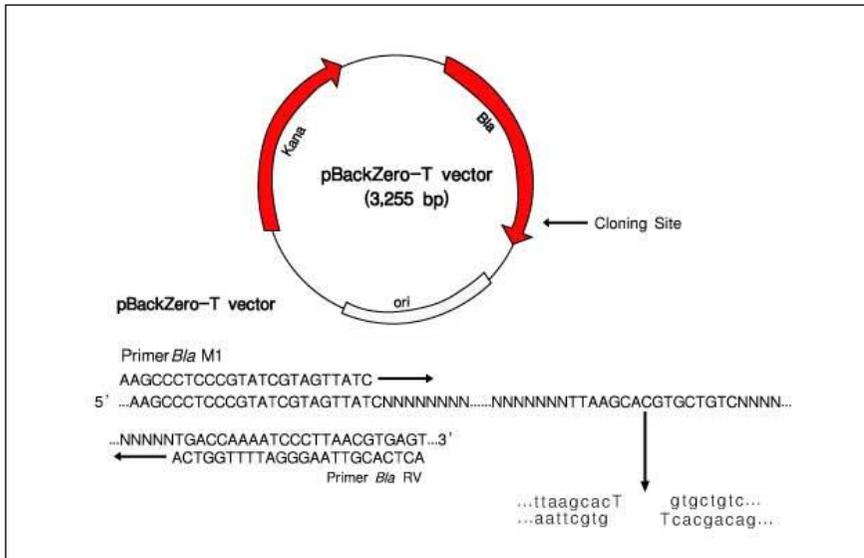
● 纯度

Control Insert 4 经克隆后，有99%以上含有Insert DNA片段。

● 用途

- 进行TA克隆，克隆PCR产物。
- 低背景需求的克隆。
- 对克隆后的DNA进行测序。
- 定向克隆。

● pBackZero-T Vector 的结构



【pBackZero-T Vector 的相关位点说明】

Vector size (bp)	3,255
Cloning site	3,255
Primer <i>Bla</i> M1	3,153–3,176
Primer <i>Bla</i> RV	101–124
ColE1 ori	163–777
Kana ^r	1,201–1,995

● 实验操作

■ Control DNA 片段的克隆实验

A) 操作方法

1) 在微量离心管中配制下列 DNA 溶液，全量为 5 μl。

试剂	使用量
pBackZero-T Vector ^{*1}	1 μl
Control Insert 4 ^{*2}	1 μl
灭菌水	3 μl

2) 加入 5 μl (等量) 的 Solution I。

3) 16°C 反应 30 分钟。

注) ① 室温 (25°C) 也能正常进行连接反应，但连接效率稍微降低。

② 5 分钟也能正常进行连接反应，但连接效率稍微降低。

4) 全量 (10 μl) 加入至 100 μl 的 JM109 感受态细胞中，冰中放置 30 分钟。

5) 42°C 加热 45 秒钟后，再在冰中放置 1 分钟。

6) 加入 890 μl 的 SOC 培养基，37°C 振荡培养 60 分钟。

7) 在含有 Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养，形成单菌落，进行菌落计数。

8) 挑选菌落，使用 PCR 法确认载体中插入片段的长度大小。

B) 实验结果

使用 Control Insert 4 时的连接/转化结果如下, 使用的感受态细胞的转化效率为: 5×10^8 cfu/ μ g pUC19 DNA。

Control Insert 4	连接/转化效率 (cfu/ μ g Vector)	效率 (%) *
+	9.55×10^5	100
-	0	-

* 效率是指白色菌落中的目的 DNA Insert 片段的连接效率。

■ 一般 DNA 片段的克隆实验

1) 在微量离心管中配制下列 DNA 溶液, 全量为 5 μ l。

试剂	使用量
pBackZero-T Vector* ¹	1 μ l
Insert DNA* ³	0.05 pmol~0.2 pmol
灭菌水	up to 5 μ l

2) 加入 5 μ l (等量) 的 Solution I。

3) 16°C 反应 30 分钟。

注) ① 室温 (25°C) 也能正常进行连接反应, 但连接效率稍微降低。

② 5 分钟也能正常进行连接反应, 但连接效率稍微降低。

③ 长片段 PCR 产物 (2 kb 以上) 进行 DNA 克隆时, 连接反应时间请延长至数小时。

4) 全量 (10 μ l) 加入至 100 μ l 的 JM109 感受态细胞中, 冰中放置 30 分钟。

5) 42°C 加热 45 秒钟后, 再在冰中放置 1 分钟。

6) 加入 890 μ l 的 SOC 培养基, 37°C 振荡培养 60 分钟。

7) 在含有 Amp 的 L-琼脂平板培养基上培养, 形成单菌落。

8) 挑选菌落, 使用 PCR 法等确认载体中插入片段的长度大小。

*1 pBackZero-T Vector 的使用量:

取 0.5 μ l 进行实验也可以得到满意结果。实际操作时, 可按实验需要确定 T 载体的使用量。
pBackZero-T Vector 1 μ l (50 ng) 的摩尔数约为 0.02 pmol。

*2 Control Insert 4:

Control Insert 4 为 500 bp 的 3' 末端带有 A 碱基的 PCR 产物(两端分别带有 TTAA), Control Insert 4 的 1 μ l (50 ng) 摩尔数约为 0.15 pmol。

*3 Insert DNA 的使用量:

在进行克隆时, Vector DNA 和 Insert DNA 的摩尔比一般为 1: 2~10。PCR 片段扩增用的 2 条 Primer 除了含有扩增目的片段用的序列外, 还要在其 5' 端均加入 TTAA 5 个碱基。当进行定向克隆时, 可以选择其中 1 条 Primer 加入 TTAA 5 个碱基。

● 相关说明

1. 感受态细胞的选择。

转化时请使用高效的热转化感受态细胞 (转化效率 $\geq 1 \times 10^8$ cfu/ μ g pUC19 DNA), 这样才可能得到比较理想的结果。

2. Insert DNA 的要求。

制备 Insert DNA 时, 需要在 PCR 扩增引物末端加 TTAA 序列, 同时, PCR 产物应进行切胶回收纯化, 尽量避免引物等其它杂质的存在。切胶回收时可使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Code No. 9762)。

3. Insert DNA 使用量的计算方法。

进行克隆时，Vector DNA 和 Insert DNA 的摩尔数比一般为 1：2~10，可以根据自己的实验情况选择合适的 Vector DNA 和 Insert DNA 的摩尔数比。Insert DNA 使用量的计算方法如下：

Insert DNA 的使用量 (ng) = nmol 数 × 660 × Insert DNA 的 bp 数

本载体 1 μl (50 ng) 的摩尔数约为 0.02 pmol。

4. 阳性克隆的检测。

由于 Insert DNA 片段末端必须带有序列 TTTAA，DNA 片段成功插入至 pBackZero-T Vector 中后，*bla* 基因得以表达，因此使用本载体在 Amp 抗性平板上生长的菌落基本都是阳性克隆，如果有必要进行阳性克隆检测时，我们建议使用 PCR 方法，扩增用引物可以使用 Primer *Bla* M1/ Primer *Bla* RV，对菌落直接进行 PCR 扩增。

5. 阳性对照实验。

为了确认实验操作的正确性以及实验试剂的有效性，我们建议进行阳性对照实验。按照实验操作方法，使用试剂盒中提供的 Control Insert 4，可以进行 10 次阳性对照实验。

6. 转化效率的计算。

取 0.1 ng 的 pUC19 Plasmid DNA 加入至 100 μl 的热转化感受态细胞中后，再加入 900 μl 的 SOC 培养基 (0.1 ng DNA/ml)，将上述培养液稀释 10 倍后 (0.01 ng DNA/ml) 取 100 μl 涂布平板 (0.001 ng DNA/100 μl)，记录菌落数。以得到 200 个克隆体为例计算转化效率，此时的转化效率 = 200 cfu/0.001 ng = 2×10^5 cfu/ng = 2×10^8 cfu/μg pUC19 DNA。

● 使用注意

1. PCR 片段扩增用的 2 条 Primer 除了含有扩增目的片段用的序列外，还要在其 5' 端均加入 TTTAA 5 个碱基。当进行定向克隆时，可以选择其中 1 条 Primer 加入 TTTAA 5 个碱基。
2. Solution I 请于冰中融解。
3. 克隆时使用的 Insert DNA 片段 (PCR 产物) 建议进行切胶回收纯化，否则 PCR 产物中的短片段 DNA (甚至是电泳也无法确认的非特异性小片段)、残存引物等杂质都会影响 TA 克隆效率。
4. 按照本实验操作进行连接后，直接进行转化时的连接液不要超过 20 μl。当要转化的 DNA 量较大或准备进行电转化时，需对连接液进行乙醇沉淀，纯化 DNA 后再进行转化。进行乙醇沉淀时使用 Dr. GenTLE Precipitation Carrier (Code No. 9094) 可以提高 DNA 的回收率。
5. 连接反应请在 25℃ 以下进行，温度升高 (>26℃) 较难形成环状 DNA。连接效率偏低时，可适当延长连接反应时间至数小时。
6. 本制品来源于 pUC19 载体，因此，适合 pUC19 载体的感受态细胞都可以使用，如：JM109 等。
7. 由于本制品是利用 β-lactamase 缺失进行筛选，所以对筛选平板使用的氨苄青霉素 (Amp) 的质量要求较高，请使用高品质的氨苄青霉素 (Amp)，工作浓度为 100 μg/ml。不要使用配制时间过长的氨苄青霉素 (Amp) 或平板。

● Q&A

Q-1 怎样提高连接转化效率?

- A-1
1. 确认 Insert DNA 片段的 3' 末端是否带有“A”尾。大部分的高保真 DNA 聚合酶(如: Takara PrimeSTAR HS、Takara *Pyrobest*、KOD、Pfx、Pfu 等)扩增的 PCR 产物是平滑末端, 不能直接进行 TA 克隆。
 2. 纯化 PCR 产物。建议使用切胶回收的 PCR 片段, 以除去 PCR 产物中的非特异性片段和引物等杂质。进行切胶回收时可以使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 (Code No. 9762)。
 3. 请使用转化效率大于 10^8 cfu/ μ g pUC19 DNA 的感受态细胞。
 4. DNA 片段的立体结构、DNA 片段的长短都会影响克隆效率。一般情况下, 大片段 DNA 的克隆效率(连接效率与转化效率)偏低, 此时可以延长连接反应时间, 或采用电转化方法。
 5. 进行切胶回收纯化 DNA 片段时, 不要使 DNA 片段在紫外线下暴露时间过长。
 6. Solution I 应尽量避免反复冻融。
 7. 建议使用新配制的平板培养基。
 8. 确保 Insert DNA 两端均带有 TTTAA 序列。

Q-2 欲对克隆 DNA 片段进行测序时, 使用何种引物?

A-2 建议使用本说明书中指定的引物 Primer *Bla* M1/ Primer *Bla* RV 进行目的片段测序反应。

Q-3 目的 DNA 片段要亚克隆至其它载体(如: 表达载体等), 酶切位点应怎样选择?

A-3 因载体上无多克隆酶切位点, 进行亚克隆时, 酶切位点可以根据亚克隆载体的情况进行选择。进行 PCR 扩增时, 应在 PCR 扩增用引物上预先引入合适的酶切位点, 克隆至本载体后再使用该限制酶切下目的 DNA 片段, 然后亚克隆至目的载体中。

本载体上不含有普通 T 载体多克隆位点处的限制酶酶切位点, 如: *Hind* III, *Sph* I, *Sse*8387 I, *Pst* I, *Hinc* II, *Acc* I, *Sal* I, *Xba* I, *Spe* I, *Nde* I, *Bam*H I, *Ava* I, *Sma* I, *Kpn* I, *Sac* I, *Eco*R I; 也不含有其他一些常用的限制酶酶切位点, 如: *Bal* I, *Bgl* II, *Bln* I, *Cla* I, *Mun* I, *Nco* I, *Nhe* I, *Not* I, *Sac* II, *Stu* I, *Xho* I。

客户可以从上述酶切位点中选择适合的酶切位点使用。其余酶切位点情况请见附表。

Q-4 pBackZero-T Vector 与其他普通的 T 载体相比有何不同?

- A-4
1. pBackZero-T Vector 背景很低, 接近于零。
 2. pBackZero-T Vector 的阳性克隆率很高, 接近于 100%, 相对于普通 T 载体具有明显优势。
 3. pBackZero-T Vector 是一个可以进行定向克隆的 T 载体。
 4. pBackZero-T Vector 转化后无需进行蓝白筛选, 在 Amp 抗性平板上生长的菌落基本都是阳性克隆, 基本可以做到克隆后不需 PCR 方法检菌, 客户也无需准备 AIX (Amp、IPTG、X-Gal) 平板, 降低了实验成本。

Q-5 阳性克隆率低或生长的菌落大部分为空载体, 为什么?

A-5 有可能是因为使用的氨苄青霉素效价低或浓度不够造成的。由于本制品是利用 β -lactamase 缺失进行筛选, 所以对筛选平板使用的氨苄青霉素(Amp)的质量要求较高, 请使用高品质的氨苄青霉素(Amp), 且工作浓度为 100 μ g/ml。不要使用配制时间过长的氨苄青霉素(Amp)或平板。

附表: pBackZero-T Vector Restriction Sites

Enzyme	#	Sites Locations	Enzyme	#	Sites Locations
<i>Aat</i> II	1	2624	<i>Mbo</i> I	19	
<i>Acc</i> II	10	223 550 1311 1329 1331 2447 2550 2552 2652 2984	<i>Mbo</i> II	13	
<i>Acy</i> I	3	1840 2621 3003	<i>Mfl</i> I	6	424 436 522 533 2896 2913
<i>Alu</i> I	18		<i>Msp</i> I	14	
<i>Asu</i> I	7	147 164 243 1711 1781 2563 3179	<i>Mst</i> I	1	66
<i>Ava</i> II	4	147 1711 1781 3179	<i>PmaC</i> I	1	356
<i>Bcn</i> I	5	104 797 2471 2506 3007	<i>Psp1406</i> I	2	60 2941
<i>Bgl</i> I	1	171	<i>Pvu</i> I	1	3174
<i>Cfr10</i> I	2	204 1699	<i>Sau3A</i> I	19	
<i>Cfr</i> I	4	763 1335 2008 3150	<i>Sca</i> I	1	3062
<i>Dpn</i> I	19		<i>Sdu</i> I	4	864 2378 2875 2960
<i>Dra</i> I	7	400 419 1524 1684 2051 2080 2965	<i>Ssp</i> I	2	2322 2738
<i>Eae</i> I	4	763 1335 2008 3150	<i>Taq</i> I	9	1076 1393 1597 1891 1930 2235 2269 2731 2889
<i>Eam1105</i> I	1	289	<i>Vsp</i> I	2	114 1346
<i>EcoO109</i> I	2	1781 2563			
<i>EcoR</i> II	4	1013 1026 1147 2125	Enzymes that do not cut pBackZero-T Vector		
<i>EcoR</i> V	1	2249	<i>Acc</i> I, <i>Acc</i> III, <i>Afl</i> II, <i>Aor51H</i> I, <i>Apa</i> I, <i>Asu</i> II, <i>Ava</i> I, <i>Bal</i> I, <i>Bam</i> H I, <i>Ban</i> II, <i>Bcl</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Bln</i> I, <i>Bss</i> H II, <i>Bst</i> E II, <i>Bst</i> X I, <i>Cla</i> I, <i>Cpo</i> I, <i>Eco52</i> I, <i>Eco81</i> I, <i>EcoR</i> I, <i>EcoT14</i> I, <i>EcoT22</i> I, <i>Hinc</i> II, <i>Hind</i> II, <i>Hind</i> III, <i>Hpa</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Mlu</i> I, <i>Mun</i> I, <i>Nae</i> I, <i>Nco</i> I, <i>Nde</i> I, <i>Nhe</i> I, <i>Not</i> I, <i>Nru</i> I, <i>PfM</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Pvu</i> II, <i>Sac</i> I, <i>Sac</i> II, <i>Sal</i> I, <i>Sfi</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Sna</i> B I, <i>Spe</i> I, <i>Sph</i> I, <i>Sse8387</i> I, <i>Stu</i> I, <i>Tth111</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I, <i>Xma</i> III		
<i>Esp</i> I	1	1973			
<i>Hae</i> II	2	934 1304			
<i>Hae</i> III	12				
<i>Hap</i> II	14				
<i>Hha</i> I	14				
<i>Hinf</i> I	5	290 804 1200 1275 1340			
<i>Mae</i> I	5	96 428 681 1355 2366			

注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品, 或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权, 请联络我们, 或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>