



Easy Clone Kit I

CL101

产品概述

Product Overview

本产品为便捷无缝克隆试剂盒。试剂盒中包含优化的 2× Easy clone 连接预混液、pUC19 control vector (linearized, Amp⁺) 及 500 bp control insert。基于载体和 PCR 片段末端的同源序列完成单片段或多片段无缝克隆重组，阳性率可达 95% 以上，是一款便捷、快速、高效的克隆试剂盒。其中 2× Easy clone 连接预混液经优化后同时适用于平末端和粘性末端连接，5 min 即可完成单片段或 15 min 完成多片段重组。

产品组成

Product Composition

组 分	RM201A
2× Easy clone Mix	2×400 μL
pUC19 control vector (50 ng/μL, Amp ⁺)	5 μL
500 bp control insert (20 ng/μL)	5 μL

引物设计示例

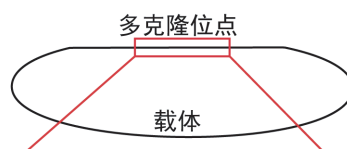
Examples of Primer Design

插入片段

5'-GGGAGGTTGAAGAACTGCGGCAG.....GCAGCAGCTGACTGCTGAAG-3'

3'-CCCTCCAATTCTTGACGCCGTC.....CGTCGTCGACTGACGACTTC-5'

克隆载体



5'-TTTAACCTTAAGAAGGAGATATACCATGGG.....CGCGCGGCAGCCATATGGCTAG.....TCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAG-3'

3'-AAATTGAAATTC TT CCTCTATATGGTACCC.....GCGCGCCGTCGATATACCGATC.....AGGCTTAAGCTCGAGGCAGCTGTTC-5'

NcoI

NdeI

EcoRI

方法一：双酶切法制备线性化载体（以NcoI和EcoRI为例）

插入片段正向扩增引物

插入片段反向扩增引物

5'-taagaaggagatataccatggGGGAGGTTGAAGAACTGCGG-3' 5'-ttgtcgacggagctcgaattcCTTCAGCAGTCAGCTGCTGCG-3'

上游载体同源臂(15-20bp) NcoI 目的基因片段正向扩增引物 (15-20 bp)

下游载体同源臂(15-20bp) EcoRI 目的基因片段反向扩增引物 (15-20 bp)

注：克隆完成后NcoI 和EcoRI 酶切位点完整保留。

方法二：单酶切法制备线性化载体（以NdeI为例）

插入片段正向扩增引物

插入片段反向扩增引物

5'-gtgcgcgcggcagccatggGGGAGGTTGAAGAACTGCGG-3' 5'-accagtcagctagccatggCTTCAGCAGTCAGCTGCTGCG-3'

上游载体同源臂(15-20bp) NdeI 目的基因片段正向扩增引物 (15-20 bp)

下游载体同源臂(15-20bp) NdeI 目的基因片段反向扩增引物 (15-20 bp)

注：克隆完成后NdeI酶切位点完整保留。

方法三：高保真酶反向PCR扩增制备线性化载体（推荐）

载体扩增正向引物：5'-GAATTCGAGCTCCGTCGACAAG-3'

载体扩增反向引物：5'-CATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC-3'

插入片段正向扩增引物

插入片段反向扩增引物

5'-gagatataccatggGAGGTTGAAGAACTGCGG-3'

5'-ggagctcgaattcCTTCAGCAGTCAGCTGCTG-3'

上游载体同源臂(15-20bp) 目的基因片段正向扩增引物 (15-20 bp)

下游载体同源臂(15-20bp) 目的基因片段反向扩增引物 (15-20 bp)

注：三种方法构建表达质粒时，均需注意同源臂设计对目的基因表达的影响，避免因密码子破坏导致氨基酸移码或突变。

注意事项

Precautions

1. 本制品每次使用时务必使用桌面离心机点离后用移液枪轻柔地吹打混匀，避免剧烈震荡，以免酶失活。
2. 反应体系需要在冰上配制，配制好的反应液需轻柔混匀离心后再放置于 PCR 仪/水浴锅中反应。

操作流程

Operation Process

➤ 重组克隆

1. 根据实验需求提前制备线性化载体和插入目的片段。
2. 按照载体和片段大小计算合适的加入量：
 - 1) Linearized Vector 使用量可根据实际载体大小在 50 ng- 200 ng 范围内进行调整，最适加入量计算方法如下：

$$\text{克隆载体使用量} = [0.02 \times \text{克隆载体碱基对数}] \text{ ng}$$

- 2) 单片段克隆的片段使用量推荐 20 ng-200 ng，片段的最适加入量可根据以下方法计算：

$$\text{插入片段使用量} = [0.04 \times \text{插入片段碱基对数}] \text{ ng}$$

- 3) 多片段克隆的片段使用量推荐 10 ng-200 ng，片段的最适加入量可根据以下方法计算：

$$\text{各片段加入量} = [0.02 \times \text{各插入片段碱基对数}] \text{ ng}$$

注：无论是单片段克隆或多片段克隆，当计算的最适加入量小于推荐的最小加入量时，直接按照推荐的最小加入量添加。

3. 于冰上配制反应体系：

反应组分	反应体系
2×Easy Clone Mix	5 μL
线性化载体	X μL
插入目的片段	Y μL
dd H ₂ O	to 10 μL

用移液枪吹打混匀反应体系，50°C 5 min 进行重组。反应结束立即冰上冷却。

注：1. 对于同源臂长度超过 15 且 GC 含量超过 60% 的单片段连接反应，可将反应时间延长至 15 min；2. 对于同源臂长度超过 15 且 GC 含量超过 60% 的多片段连接反应，可将反应时间延长至 30min。

➤ 感受态细胞转化

1. 取出感受态细胞置于干冰上，待细胞融化后混匀细胞，10 μL 重组产物中加入 100 μL 感受态细胞。冰上静置 30 min。
2. 42°C 45 sec 进行转化，立即置于冰上冷却 2-3 min。取 900 μL LB 培养基（不添加抗生素）置于 15 mL 离心管，加入完成转化的细胞混合液，37°C 摇菌 1 h（转速 200–250 rpm）。
3. 5,000 rpm (2,400×g) 离心 5 min，弃去 900 μL 上清培养基，用余量培养基重悬剩余菌体。
4. 用无菌涂布棒在对应抗性培养基上涂布。
5. 37°C 培养箱中倒置培养 12-16 h。12-16 h 后，平板上可见数个经重组反应的单克隆，挑取若干个克隆进行菌落 PCR 鉴定。

常见答疑

Frequent Asked Questions

Q1: 为什么平板上没有或者很少菌落?

A1: 建议使用试剂盒附带的阳性对照,可排除实验操作本身的影响。进一步判定,主要有以下可能的情况和建议:

(1) 载体制备

线性化载体和插入片段的纯度不够,抑制反应。

(2) 插入片段制备

引物设计不正确:同源臂 15~25nt (不计算酶切位点),CG 含量 40~60%。

若线性化载体与插入片段已经过纯化,且经电泳检测条带或无 Smear 残留时,可使用超微量核酸蛋白检测仪进行浓度测定,当 A260/A280 在 1.8~2.0 之间时,浓度值可信,未纯化的 DNA 使用体积不能超过反应体积的 1/5。

(3) 重组过程载体和片段比例不合适

线性化载体和插入片段的投入量不足或过量,比例不佳,按照说明书推荐的最适用量和比例配制反应体系。

(4) 转化

感受态效率低:感受态转化效率大于 10⁸ cfu/ug,重组产物的体积不能超过感受态的 1/10。

Q2: 跑出来的菌落 PCR 无条带

A2: 主要有以下可能的情况和建议:

(1) 重组失败:若只有空质粒条带,表明重组失败,载体线性化不彻底,优化酶切体系或 PCR 体系。

(2) 引物不正确,使用通用引物或者至少一条通用引物进行菌检。

(3) PCR 体系或者程序不合适:没有目的条带也没有空质粒条带,优化 PCR 体系和程序(T_m,模板投入量,循环数等);进行提质粒做模板,进行 PCR 验证或者酶切验证。

Q3: 假阳性克隆数目多

A3: 可能的原因和建议

(1) 克隆载体线性化不完全:重新酶切您的载体,增加酶切时间,并胶回收纯化。

(2) PCR 使用的模板质粒抗性与所需克隆载体抗性相同造成的污染:可在 PCR 反应之前先将模板质粒线性化;PCR 产物用 DpnI 处理,消化模板质粒,然后再纯化。

(3) 转化用平板放置时间过长导致抗性失效:确认平板新鲜配置,并含有正确、适量的抗生素。

保存条件

Storage Conditions

-30 ~ -15℃保存,干冰/-20℃运输。