



## 注意事项

Precautions

1. 使用前请使用桌面离心机点离后用移液枪轻柔吹打混匀，避免剧烈震荡，以免酶失活。
2. 反应体系需在冰上配制，配制好的反应液轻柔混匀，短暂离心后放置于 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：

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

注：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×Single EasyClone Mix	5 μL
线性化载体	X μL
插入目的片段	Y μL
dd H <sub>2</sub> O	to 10 μL

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：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；

### ➤ 感受态细胞转化（以DH5 $\alpha$ 感受态细胞为例）

1. 取出感受态细胞置于冰上，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 热激转化，然后立即置于冰上冷却 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 摆菌 1 h（转速 200-250 rpm）。
3. 5,000 rpm 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. 取剩余 100 μL 菌液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 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。

## 保存条件

Storage Conditions

-30 ~ -15°C 保存，干冰/-20°C 运输。