



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、Linearized PUC19 Control vector (50 ng/μL, Amp⁺) 及 0.5 kb Positive 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。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	CL101A 10 rxns	CL101B 40 rxns
2× Easy clone Mix	50 μL	2×100 μL
Linearized PUC19 Control vector (50 ng/μL, Amp ⁺)	5 μL	5 μL
0.5 kb Positive Control Insert (20 ng/μL)	5 μL	5 μL

引物设计示例

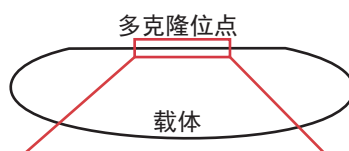
Examples of Primer Design

插入片段

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

3'-CCCTCCAACCTTCTTGACGCCGTCCGTCGTCGACTGACGACTTC-5'

克隆载体



5'-TTTAACCTTTAAGAAGGAGATATACCATGGG.....CGCGCGGCAGCCATATGGCTAG.....TCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAG-3'

3'-AAATTGAAATTCCTCTATATGGTACCC.....GCGCGCCGTCGTATACCGATC.....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'-ttgtcgcaggagctcgaattcCTTCAGCAGTCAGCTGCTGCG-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'-gtgccgcgcggcagccatgGGGAGGTTGAAGAACTGCGG-3' 5'-accagtcagctagccatgCTTCAGCAGTCAGCTGCTGCG-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'-gagatataccatgGGGAGGTTGAAGAACTGCGG-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. 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：

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

- 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	阳性对照 ^{1*}	阴性对照 ^{2*}
2×Single EasyClone Mix	5 μL	5 μL	0 μL
线性化载体	X μL	1 μL Linearized PUC19 Control vector	X μL
插入目的片段	Y μL	1 μL 0.5 kb Positive Control Insert	0 μL
dd H ₂ O	to 10 μL	to 10 μL	to 10 μL

1* 阳性对照反应可用来排除其他实验材料及操作因素的影响；

2* 阴性对照可用来确认线性化克隆载体中是否有环状质粒残留，推荐进行。

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 30 min。

➤ 感受态细胞转化

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 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 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弥散和拖尾时, 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°C 保存, 干冰/-20°C 运输。保质期限 18 个月。