



Single EasyClone Kit

CL100

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×Single EasyClone Mix 连接预混液、Linearized PUC19 Control vector 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无缝克隆重组，阳性率可达 95% 以上。其中 2×Single EasyClone Mix 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 即可完成重组。

产品组成

Product Composition

组 分	CL100A 10 rxns	CL100B 40 rxns
2×Single EasyClone 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

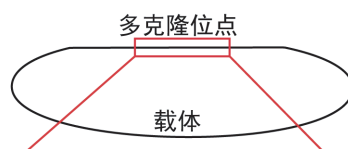
Examples of Primer Design

插入片段

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

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

克隆载体



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

3'-AAATTGAAATTC TT CCTCTATATGGTACCC.....GCGCGCCGTCGCTATACCGATC.....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'-gtgcgcgcggcagccatagGGGAGGTTGAAGAACTGCGG-3' 5'-accagtcagtcagccatagCTTCAGCAGTCAGCTGCTGCG-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	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℃ 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DH5α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℃ 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℃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. 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℃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℃保存，干冰/-20℃运输。