

pEASY[®]-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit 基础版同源重组无缝克隆试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

目录号: CU201

版本号: Version 2.1

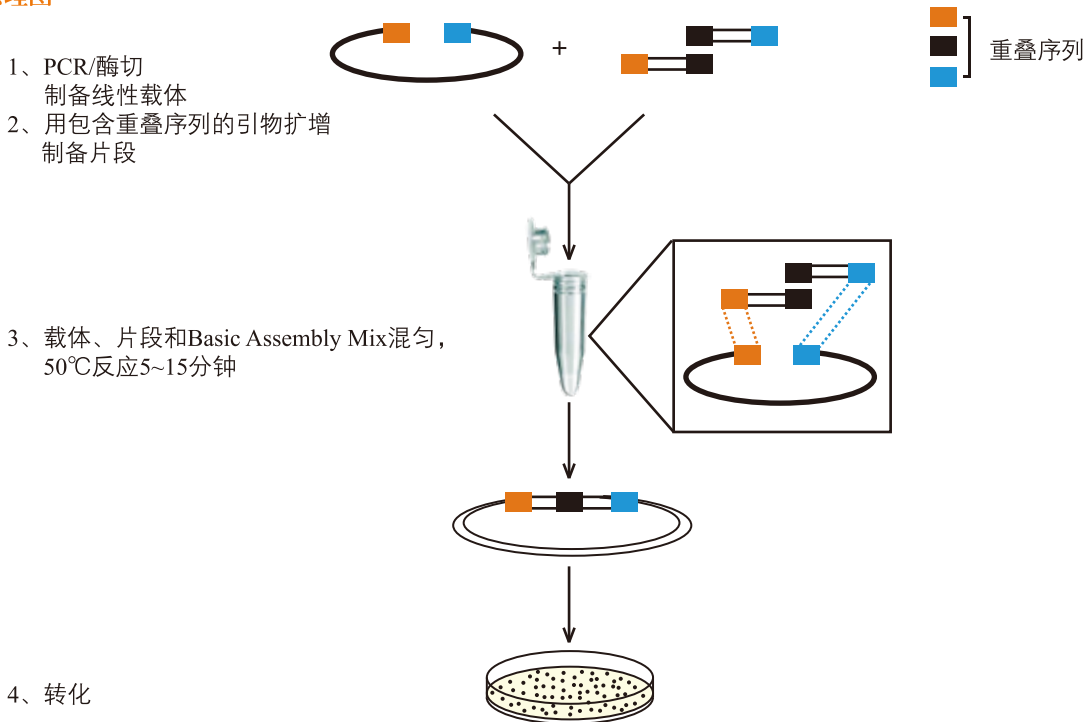
保存: -18°C及其以下温度下保存两年。

产品说明

本产品利用特殊的重组酶和同源重组的原理, 可以将任意方法线性化后的载体和与其两端具有15-25 bp重叠区域的PCR片段定向重组, 可以实现1-5个片段的高效无缝拼接。

- 快速: 仅需要5~15分钟反应时间。
- 简单: 不受片段酶切位点的影响, 无需对片段酶切。
- 高效: 阳性率达95% 以上。
- 无缝: 不引入额外的序列。

克隆原理图



适用范围

短、长片段克隆, 多片段重组, 高通量克隆等

试剂盒组成

Component	CU201-02	CU201-03	CU201-13
2×Basic Assembly Mix	100 μl	3×100 μl	-
2×Basic Assembly Mix (+Dye)	-	-	3×100 μl
Linearized pUC19 Control Vector (10 ng/μl)	6 μl	18 μl	18 μl
Control Insert (1 kb, 20 ng/μl)	6 μl	18 μl	18 μl



基因克隆操作

载体和目的片段的制备

A: 载体的制备

- (1) 酶切来源: 酶切所得线性载体, 平端或粘端均可, 酶切后进行胶回收。
- (2) PCR来源: *Pfu*系列高保真DNA聚合酶制备, 如果扩增条带单一则可以通过PCR纯化获得载体, 否则通过胶回收获得载体。

PCR来源线性载体胶回收或PCR纯化前建议加入DMT酶降解质粒模板, 从而提高克隆的阳性率。

DMT酶 (目录号: GD111) 可以在PCR结束后加入 (50 μl体系加1 μl), 于37°C孵育30分钟即可。

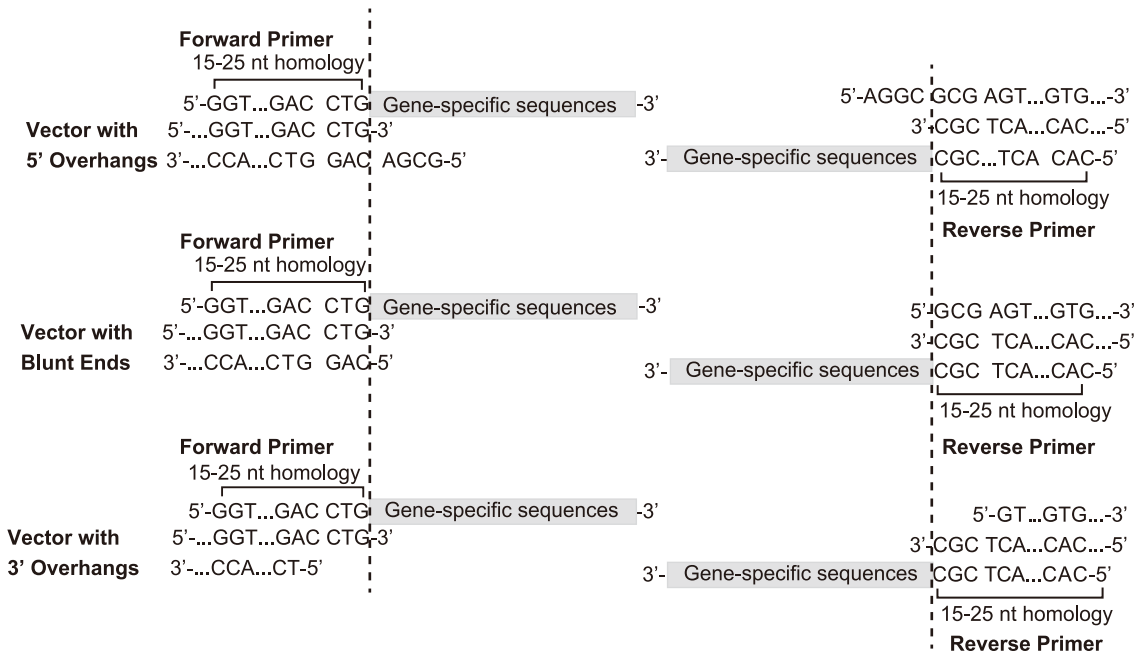
B: 目的片段的制备

- (1) 单个片段的克隆引物设计: 克隆引物包括目的片段特异性引物序列和重叠序列。

克隆正向引物 (5'-3'): 线性载体正向15-25 nt重叠序列+目的片段正向特异性引物序列 (20-25 nt)

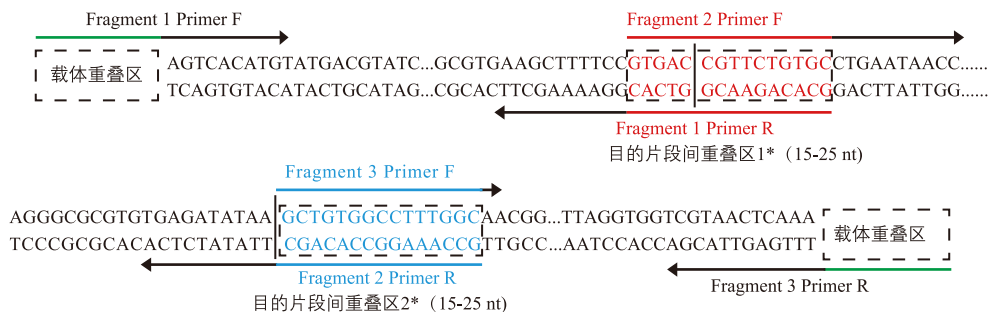
克隆下游引物 (5'-3'): 线性载体反向15-25 nt重叠序列+目的片段反向特异性引物序列 (20-25 nt)

按照线性载体末端的结构(5'突出、3'突出、平端), 引物设计分为如下三种情况, 其示意图如下:



所得线性载体的两端因线性方式 (如: 单酶切、双酶切、反向PCR等) 不同, 可为以上三种末端结构的两两任意组合。目的片段特异性引物的设计遵循通常引物设计的原则即可。

- (2) 多个目的片段的克隆引物设计: 载体两端引物设计方法同单片段设计方法, 片段间引物设计方法见下图例。



*目的片段间重叠区设计有上述两种选择方式。在多片段引物设计时，选择任意一种方式或两种方式混用均可。

(3) 酶的选择：*Pfu*系列高保真DNA聚合酶。

(4) 反应条件：建议克隆引物在PCR中终浓度为0.2-0.4 μM ，由于克隆引物较长（通常40 bp左右）其 T_m 较高，所以PCR时退火温度通常在60-68 $^{\circ}\text{C}$ 可扩增出目的条带，其余条件根据所用PCR酶确定。

(5) 纯化目的片段

- 如果片段来源于质粒模板，且该质粒与重组载体具有相同抗性，建议将目的片段用DMT酶消化后，进行纯化。
- 如果片段单一，则建议用PCR纯化试剂盒（目录号：EP101）纯化片段。
- 如果有非特异扩增，则建议用胶回收试剂盒（目录号：EG101）回收片段。

注：

- 用该方法克隆后，线性载体所用酶切位点可能缺失或增加，建议如对酶切位点有严格要求的，注意酶切位点的选择，必要时可在克隆引物正向或反向增加缺失掉的碱基来恢复原有酶切位点。
- 如果重组质粒用于蛋白表达，则在引物设计时注意读码框，蛋白表达及纯化所需序列（如启动子序列，RBS序列，起始密码子，终止密码子，蛋白标签等）不被破坏。

克隆反应体系的建立

2 \times Basic Assembly Mix 或2 \times Basic Assembly Mix (+Dye)	5 μl
Linearized vector (5-100 ng)	x μl *
Inserts	y μl *
Nuclease-free Water	to 10 μl

* 10 μl 反应体系中，载体与各个插入片段加入量建议均在0.01-0.25 pmols，载体与各个插入片段的最佳摩尔比为1:1~1:2。载体与各个插入片段的推荐加入量可按下列公式进行近似计算：

载体推荐加入量：（0.02 \times 片段长度bp数）ng， \approx 0.03 pmol

插入片段推荐加入量：（0.02~0.04 \times 片段长度bp数）ng， \approx 0.03~0.06 pmol

更准确的载体与各个插入片段pmol数准确计算公式可参考后文注意事项。

轻轻混合，50 $^{\circ}\text{C}$ 反应5~15分钟。反应结束后，将离心管置于冰上冷却数秒。之后可将重组产物保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 或直接用于转化。

转化

- (1) 在冰上融化*Trans1-T1*感受态细胞（目录号：CD501）。
- (2) 在50 μl 细胞中加入2 μl 的重组产物，轻轻弹动离心管壁混匀（禁止涡旋）后，在冰上放置30分钟。
- (3) 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中热激30秒，之后马上转至冰上冷却2分钟。
- (4) 加入450 μl 常温的SOC或LB培养基，之后37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中250 rpm培养1小时。
- (5) 将适宜抗性的LB平板在37 $^{\circ}\text{C}$ 中预热。
- (6) 取100 μl 细胞均匀地涂在平板上，之后在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中过夜培养。

阳性克隆检测

• PCR 方法鉴定阳性克隆

- (1) 挑选单个克隆至10 μl 无菌水中，涡旋或吹吸混合。
- (2) 取1 μl 混合液于25 μl PCR体系，用合适的正、反向引物鉴定阳性克隆。

• 限制性酶切分析阳性克隆

挑选单个克隆接种于适宜抗性的液体培养基中，过夜培养。用质粒小提试剂盒（目录号：EM101）提取质粒，选择适宜的限制性内切酶，酶切鉴定重组子。



• 测序

用载体的通用引物测序，进行序列分析。

对照克隆反应体系

2×Basic Assembly Mix或2×Basic Assembly Mix (+Dye)	5 μl
Linearized pUC19 Control Vector	1 μl
Control Insert	1 μl
Nuclease-free Water	3 μl

反应条件，转化和阳性克隆检测方法同上相应部分。

注意事项

- 纯化或回收的载体或目的片段品质较差会显著降低克隆阳性率。
- 菌落少时，建议转化时适当增加重组产物的量，或者增加菌液涂布量。
- 随着重组质粒长度的增加 (>15 kb)，克隆效率降低，建议转化时选择感受态细胞 *Trans2-Blue Chemically Competent Cell* (目录号: CD411)。
- 随着重组片段数目的增加，克隆效率降低，建议增加引物重叠序列长度或适当延长反应时间。
- 载体与插入片段的pmol数准确计算公式为: $\text{pmols} = \frac{\text{质量ng}}{(\text{片段长度bp} \times 0.65 \text{ kDa})}$
如: 100 ng的2000 bp的片段等于 $100 / (2000 \times 0.65)$ 约0.08 pmols。
100 ng的5000 bp的片段等于 $100 / (5000 \times 0.65)$ 约0.03 pmols。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V2.1-202311

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

