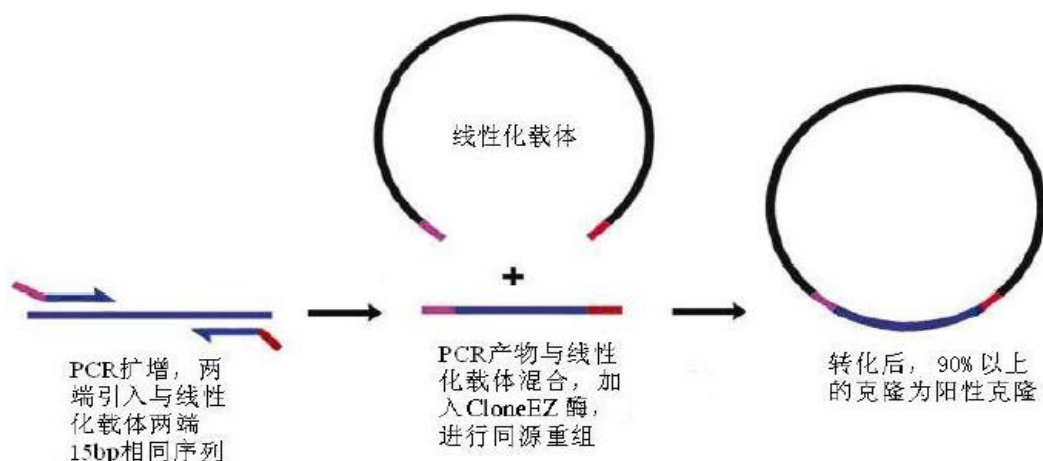


CloneEZ PCR 克隆试剂盒

本试剂盒为非内切酶依赖的克隆系统，可快速和高通量地将 PCR 产物定向克隆到任何载体中，只需将 200 bp 到 10kb 的 PCR 片段与线性化的载体混合，用本试剂盒提供的专有酶处理 30 分钟后即可转化，阳性率 90% 以上。（具体原理见下图）。



主要特色：

- 1.快速、定向地克隆 PCR 产物，阳性克隆比例高（90%以上）。
- 2.PCR 产物与线性化载体无需酶切、去磷酸化处理，适合高通量克隆。
- 3.可有效克隆 10 kb 的 DNA 片段。

试剂盒组分	体积
CloneEZ Enzyme (5 U/μl)	50 μl
10× CloneEZ Buffer	100 μl
pUC57 Linearized with EcoRI/HindIII, positive control (30 ng/μl)	10 μl
1-kb Control Insert, positive control (100 ng/μl)	10 μl
Manual	1

本试剂盒-20 °C条件下，保质期为一年。注：缓冲液中有活性成分，不稳定，不能反复冻融，可以将其分装保存。

使用方法：

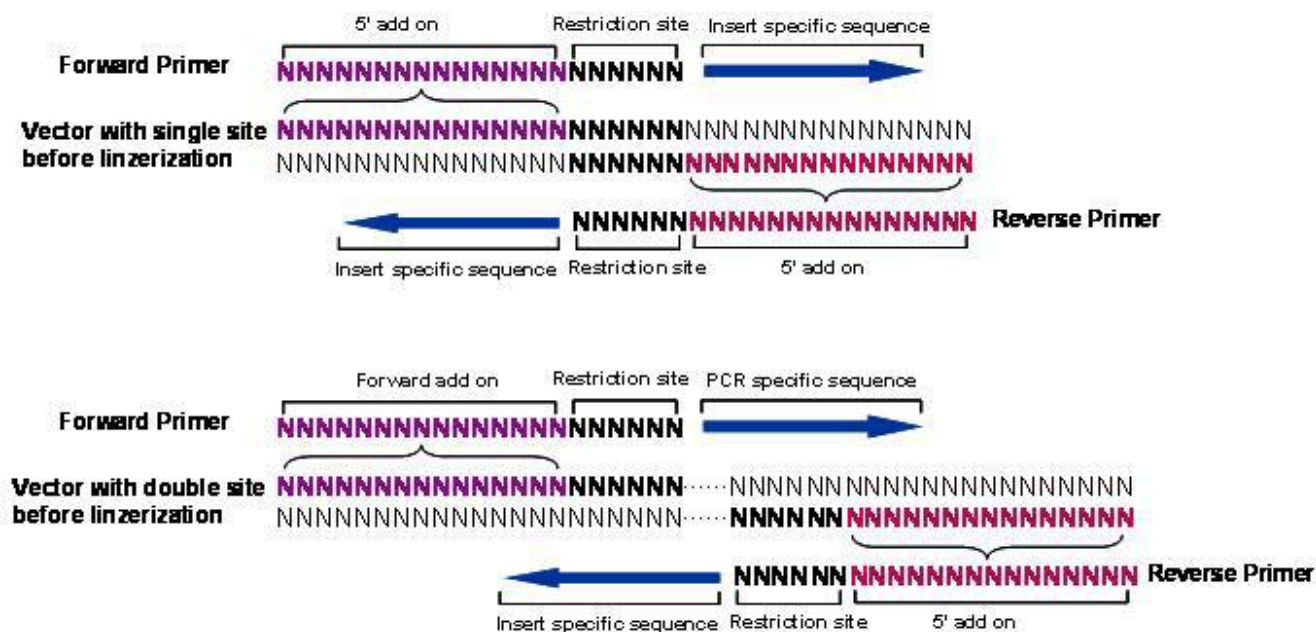
A. 线性化质粒的制备

线性化质粒可通过 PCR 扩增、单酶切或双酶切（推荐使用）制备。质粒的线性化不彻底将导致阴性克隆的产生，所以一般建议通过双酶切或 PCR 扩增的方法进行质粒线性化。如使用 PCR 扩增获得线性化质粒，所用的聚合酶应选用高保真酶（如 pfu 酶），并确保所选酶不会在产物末端加“A”，以减少扩增突变的引入。

注意：1. 在酶切位点的选择上，尽量选择无重复序列且 GC 含量正常的区域进行克隆，否则，重组率会受到影响；
2. 由于重组体系内无连接酶，正常情况下不会发生载体自连，因此，以单酶切方式制备的线性化载体也无需进

B. 目标 DNA 的 PCR 扩增

利用 PCR 扩增目标 DNA，所用的聚合酶应尽量选用高保真酶（如 pfu 酶），并确保所选酶不会在产物末端加“A”。PCR 产物中的引物或引物二聚体会抑制重组反应，因此推荐胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。利用本试剂盒克隆目标 DNA，需要目标 DNA 的两端含有与载体两端相同的 15 bp 核酸，所以设计引物时要将这 15-20 bp 的核酸加到特异性引物 5' 端，如果保留酶切位点，将保留的酶切位点序列加入到引物中，具体设计见下图：



C. 目标 DNA 与载体的重组

1. 将下列混合物小心加到 0.5 ml 的 eppendorf 管的管底或 PCR 管的管底（如果不慎将液体粘在管壁，请务必通过短暂离心使其沉入管底）。

以 20 μ l 反应体系为例:

线性化载体 (30 ng/μl)	6 μl
纯化的 PCR 产物 (100-200 ng/μl)	n μl
10X CloneEZ Buffer	2 μl
CloneEZ Enzyme	2 μl
去离子水	补足 20 μl

一般来说，反应体系中多添加一些 PCR 产物，会使阳性克隆增多，较长的 PCR 片段要增加其添加量，以维持其适当摩尔数目。对于不同大小的 PCR 片段，建议加入下列体积：

PCR DNA of 1 kb	n = 4
PCR DNA of 2 kb	n = 6
PCR DNA of 3 kb	n = 8

PCR DNA of >3 kb

n = 10

2. 将其混合物在 22 °C 保持 30 分钟，之后在冰上保持 5 分钟。
3. 可立即进行转化，也可 -20 °C 保存，以后再转化。

D. 转化

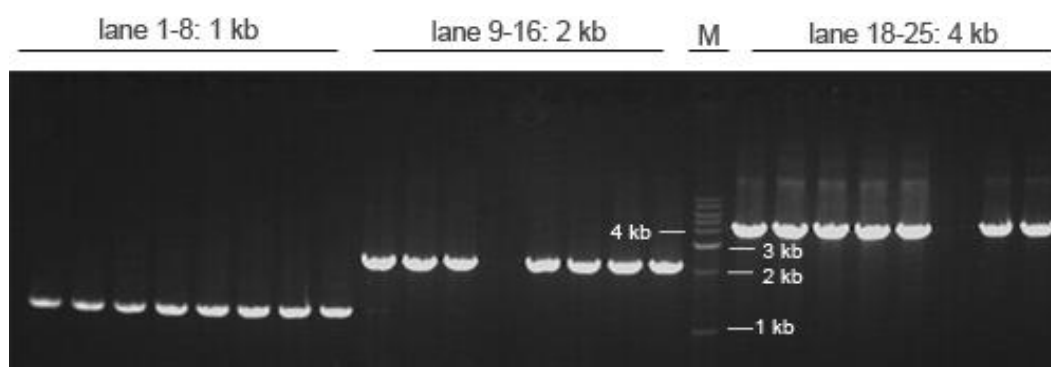
1. 转化前请自行准备 42 °C 水浴，SOC 液体培养基，DH5α 或 Top10 感受态细胞 ($>1 \times 10^8$ cfu/μg)；
2. 冰上融化一管 100 μl 的感受态细胞，轻弹管壁使细胞重悬起来。加入 20 μl 的反应液到感受态细胞中，轻弹数下，置冰上孵育 30 分钟；
3. 42 °C 水浴中热激 90 秒，冰上孵育 5 分钟；
4. 向细胞中加入 1 ml SOC 培养基，37 °C 轻摇 1 小时，转速为 200 rpm；
5. 5000 rpm 离心 5 分钟收集菌体，用 100 μl SOC 液体培养基重悬菌体；
6. 将菌体均匀地涂布在含抗生素平板上，37 °C 过夜培养。

应用举例：

使用 CloneEZ PCR 克隆试剂盒分别将 1 kb、2 kb 和 4 kb 的 PCR 产物（λDNA 为模板）克隆到 Puc57 载体中（产品编号：SD1176，金斯瑞），转化子和重组阳性率见下表：

	1 kb	2 kb	4 kb
转化子	≈ 1200	≈ 800	221
重组阳性率	100%	95%	93%

CloneEZ PCR 克隆试剂盒单克隆的菌落 PCR 鉴定结果：



可能遇到的问题及解决办法：

可能出现的问题	形成原因	解决方法
转化后没有长出克隆子或克隆子数目很少	感受态效价太低	核查感受态效价，确保大于 1×10^8 cfu/ μ g
	反应物加入过多	50 μ l 的感受态不要加入超过 20 μ l 的反应物，过多的反应物会抑制转化效率
	PCR 产物或线性化载体中含有抑制重组反应的污染物	PCR 产物或线性化载体都需要纯化，可考虑本公司的 PCR 和胶回收纯化试剂盒
	重组反应时间过长或过短	将重组反应时间严格控制在 30 分钟
	目标 DNA 过大	将目标 DNA 分步重组到目标载体中
大多数的克隆不含插入片段	克隆载体没有很好的线性化	胶回收线性化载体，或用 PCR 扩增的线性化载体
	反应体系中污染了含有同样抗性的其他质粒，或载体/片段不纯，抑制反应	纯化的 PCR 产物中可能含有大量的模板质粒，线性化载体中可能含有酶切不完全的质粒，胶回收 PCR 产物
	重组臂与载体序列有同源性	重新设计重组臂和克隆位点

订购信息

CloneEZ PCR克隆试剂盒

产品编号: L00339

南京金斯瑞生物科技有限公司

江苏省南京市江宁科学园雍熙路28号，邮编211100

客服热线: 025-58897288-5810

订购邮箱: product@genscript.com.cn

公司主页: <http://www.genscript.com.cn>