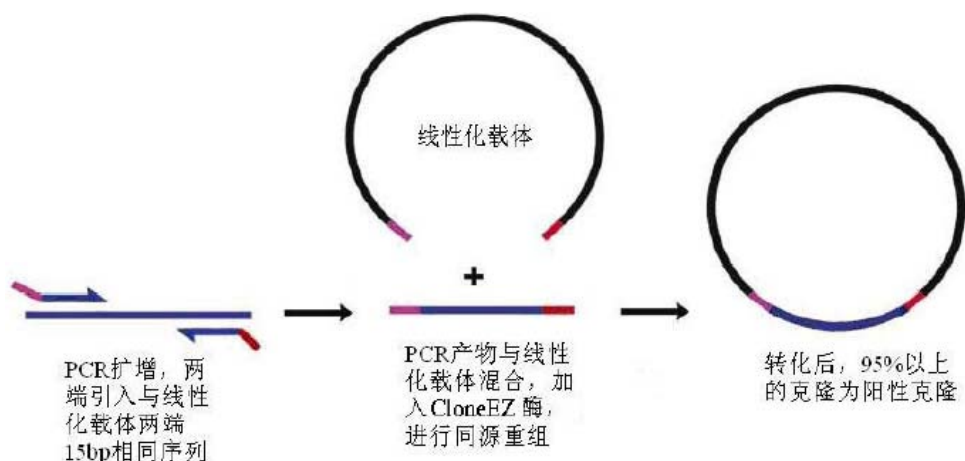


CloneEZ®重组克隆试剂盒

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 12 kb 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，阳性率在 95% 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（95%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 12 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/ <i>Hind</i> III, 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 *Taq* 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

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 10-15 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。

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/μg
	反应物加入过多	50 μl 的感受态不要加入超过 20 μl 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，市面上的试剂盒不是都能产生高质量的纯化效果，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
	连接产物或载体过大	将连接产物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®重组克隆试剂盒

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

公司主页: <http://www.genscript.com.cn>