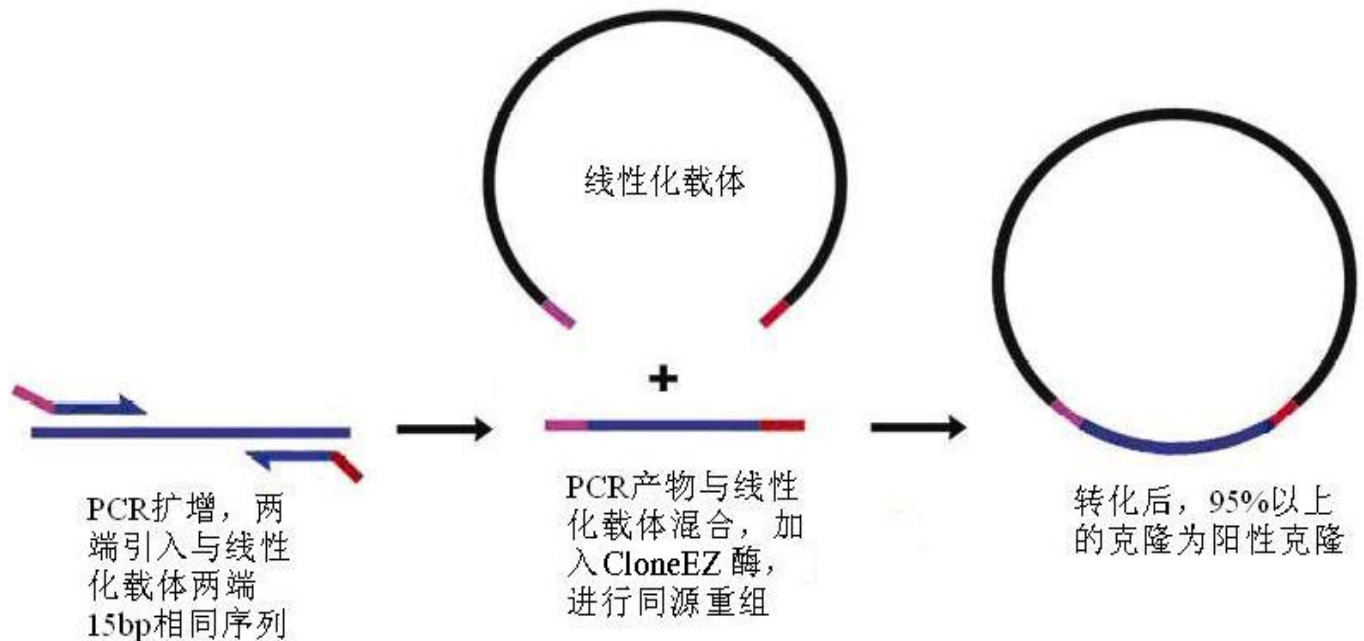


CloneEZ[®]重组克隆试剂盒

本试剂盒为非内切酶依赖的克隆系统，可快速和高通量的将 PCR 产物定向克隆到任何载体中，只需将 200 bp 到 15 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，定向的克隆 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 15 kb 的 DNA 片段。
4. 如果长片段不易 PCR 扩增获得，可将次长片段分解为 2-4 个较短片段分别扩增，每个片段首尾重叠 15 bp 核苷酸，利用本试剂盒可将这些片段首尾连接形成全长片段，并克隆到载体中。

试剂盒组分:	
CloneEZ Enzyme (5 U/μl)	50 μl
10X CloneEZ Buffer	100μl
pUC19 Linearized with KpnI/HindIII(100 ng/μl), positive control	10 μl
1-kb Control Insert (100 ng/μl), positive control	10 μl
Manual	1

本试剂盒-20 °C 条件下，保质期为一年

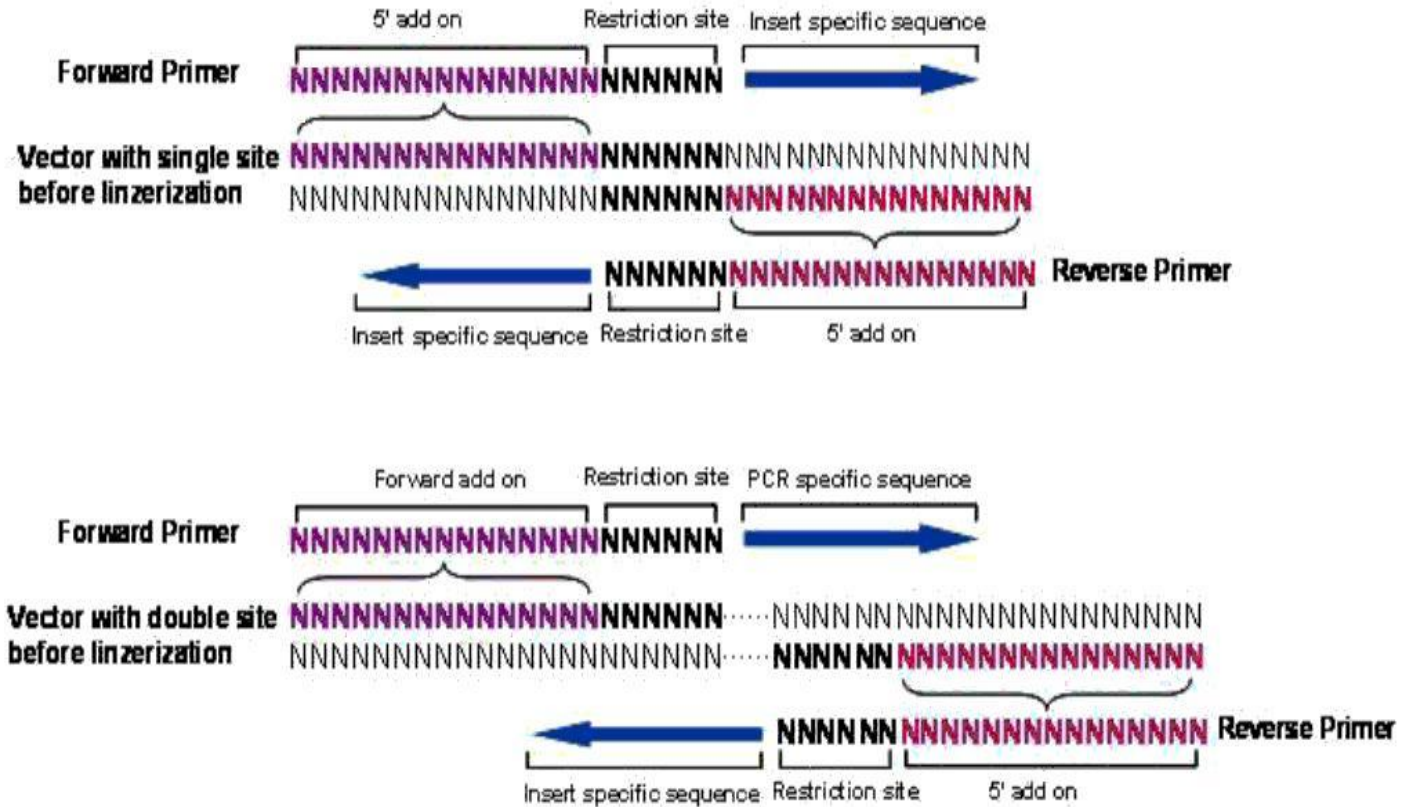
使用方法:

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”。

B. 目标 DNA 的 PCR 扩增

利用 PCR 扩增目标 DNA,所用的 Taq 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”。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 bp 的核酸加到特异性引物 5'端，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）。

线性化载体 (100-200 ng/μl)	6 μl
纯化的 PCR 产物(100-200 ng/μl) n 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℃保存，以后再转化。

D. 转化

转化前请自行准备 42℃ 水浴，SOC 液体培养基，DH5α 感受态细胞($>1 \times 10^8$ cfu/μg)

- 1.冰上融化一管 50 μl 的感受态细胞，轻弹管壁使细胞重悬起来。加入 5 到 8μl 的反应液到感受态细胞中，轻弹数下，置冰上孵育 30 分钟。
- 2.42℃水浴中热激 45~90 秒，冰上孵育 2 分钟。
- 3.6000 rpm 离心 2 分钟收集菌体，用 100μlSOC 液体培养基重悬菌体。
- 4.将菌体均匀的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
	反应物加入过多	50 μl 的感受态不要加入超过 10 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。
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
	反应体系中污染了含有同样抗性的其他质粒	纯化的 PCR 产物中可能含有大量的模板质粒，胶回收 PCR 产物。