

One Step Cloning and Assembly Kit

Cat# NC0001

产品概述

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。

产品/组分信息

组分编号	组分名称	NC0001-5T	NC0001-20T
NC0001-5T/20T-1	2× Assembly Mix	25 μL	100 μL
NC0001-5T/20T-2	Linearized pUC19 Control Vector (10 ng/μL)	1.5 μL	6 μL
NC0001-5T/20T-3	Control Insert (1 kb, 20 ng/μL)	1.5 μL	6 μL

储存方式

-25~-15℃ 保存。

使用说明

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，建议转化时选择转化效率更高的感受态细胞或者电转。
- 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：pmol= 质量 ng / (片段长度 bp×0.65 kDa)。

例：100 ng 的 2000 bp 的片段等于 100/(2000×0.65)约 0.08 pmol。

100 ng 的 5000 bp 的片段等于 100/(5000×0.65)约 0.03 pmol。

使用方法

载体制备

- 酶切来源：酶切所得线性载体，平末端或粘性末端均可，酶切后进行胶回收。
- PCR 来源：使用高保真 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 来源的线性载体胶回收或 PCR 纯化前建议加入 Dpn I 酶降解质粒模板，从而提高克隆的阳性率。

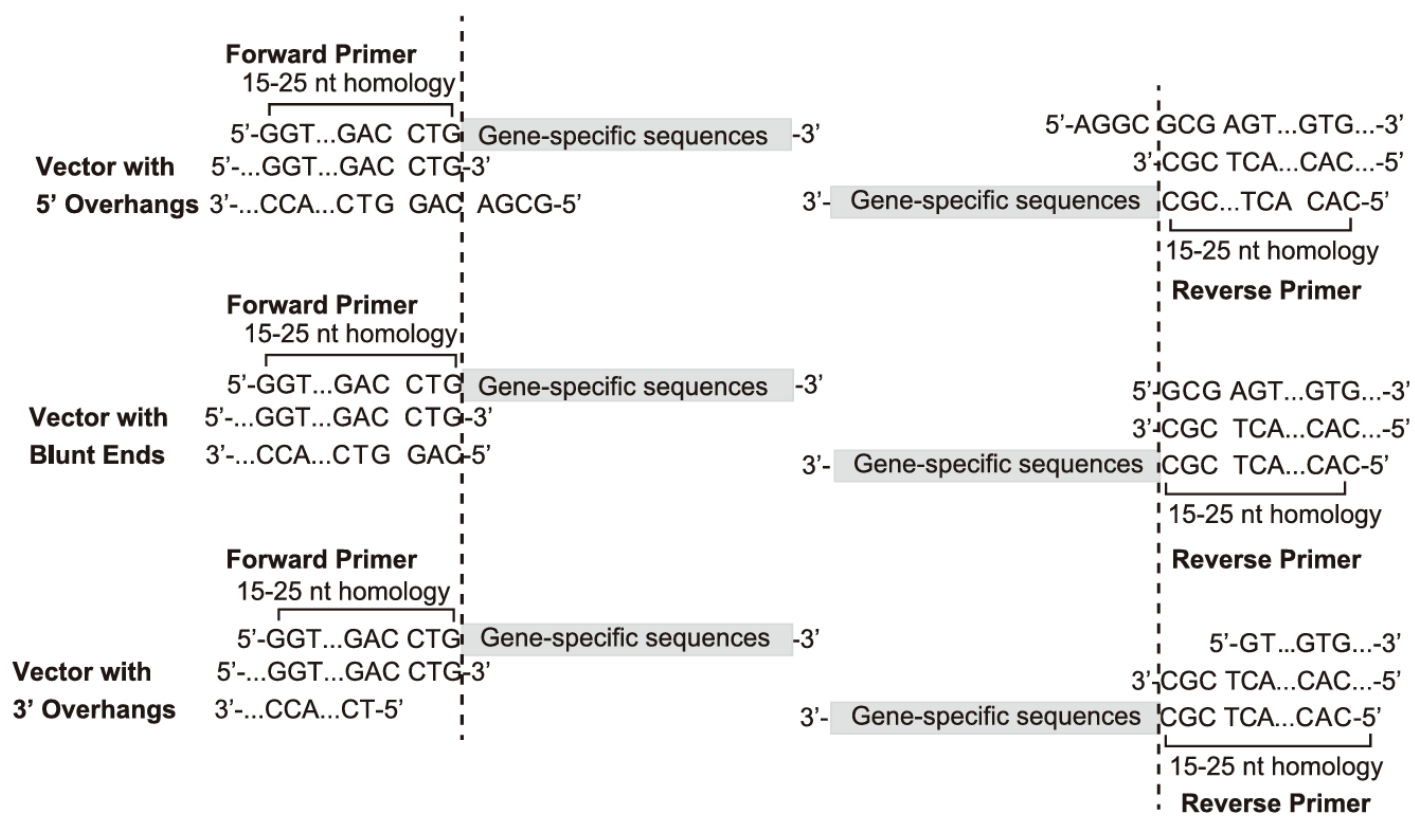
目的片段制备

- 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 15-25nt 重叠序列+目的片段正向特异性引物序列(20-25 nt)

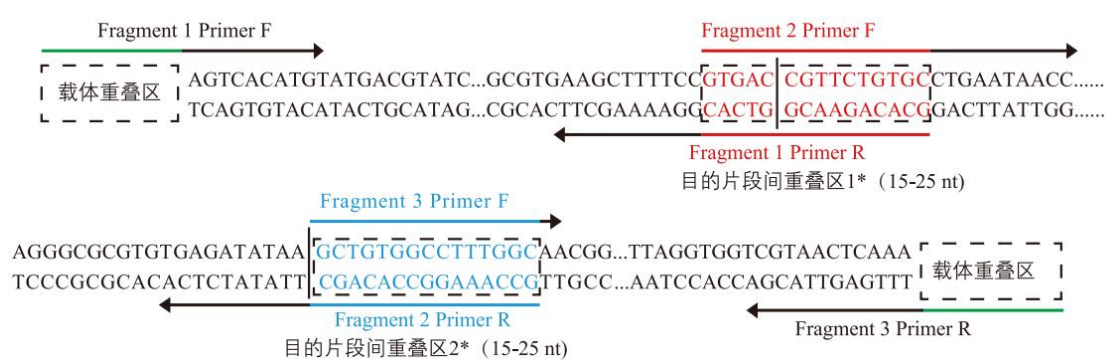
克隆下游引物(5'-3')：线性载体反 15-25nt 重叠序列+目的片段反向特异性引物序列(20-25 nt)

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。



【注】：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：需使用高保真 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 Dpn I 酶消化后，进行纯化。
如果片段单一，则建议用 PCR 纯化试剂盒纯化片段；如果有非特异扩增，则建议用胶回收试剂盒回收片段。

克隆反应体系的建立

表 1. 克隆反应体系

组分	体积
2× Assembly Mix	5 μL
Linearized Vector (5-100 ng)	X μL^*

组分	体积
Inserts	Y μL *
Nuclease-Free Water	Up 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 pmol，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×片段长度 bp 数)ng，约 0.03 pmol

插入片段推荐加入量：(0.02~0.04×片段长度 bp 数)ng，约 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注意事项。

重组反应

轻轻混合，50 °C 反应 5~15 min。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 °C 或直接用于转化。

转化

1. 在冰上融化感受态细胞。
2. 在 50 μL 感受态细胞中加入 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 min。
3. 42 °C 水浴中热激 30 sec，之后马上转至冰上冷却 2 min。
4. 加入 450 μL 常温的 SOC 或 LB 培养基，之后 37 °C 摇床中 250 rpm 培养 1 h。
5. 将适宜抗性的 LB 平板在 37 °C 中预热。
6. 取 100 μL 细胞均匀地涂在平板上，之后在 37 °C 培养箱中过夜培养。

阳性克隆检测

1. PCR 方法鉴定阳性克隆

挑选单个克隆至 10 μL 无菌水中，涡旋或吹吸混合。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。

2. 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。用质粒小提试剂盒提取质粒，选择适宜的限制性内切酶，酶切鉴定重组子。

3. 测序

用载体的通用引物测序，进行序列分析。

附：表 2. 对照克隆反应体系

组分	体积
2× Assembly Mix	5 μL
Linearized Vector (5-100 ng)	1 μL
Control Inserts	1 μL
Nuclease-Free Water	3 μL

Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: www.cytoch.com.

Or contact us by:

E-mail: support@cytoch.com

Tel: 400-969-8881

For research use only.

CYTOCH