

ClonPlus One Step Cloning Mix

产品货号：500-201

产品简介

ClonPlus 采用了一种简单、快速并且高效的 DNA 片段定向克隆技术,可将目的片段定向克隆至任意载体的任意位点。将载体进行线性化,在目的片段的两条 PCR 扩增引物的 5' 端分别引入线性化载体的末端序列,使得目的片段经 PCR 扩增后,其 5'端和 3'端分别带有与线性化载体的两个末端 15~20 nt 的序列同源的序列。将两端带有同源序列的 PCR 产物与线性化的载体按一定比例混合后,在重组酶的催化下,只需 5~45 min 就可以实现 DNA 片段的定向克隆。ClonPlus One Step Cloning Mix 无缝克隆试剂盒,一次反应可高效完成单个至多个 DNA 片段的同源重组,兼容性广且阳性率高。

产品组成

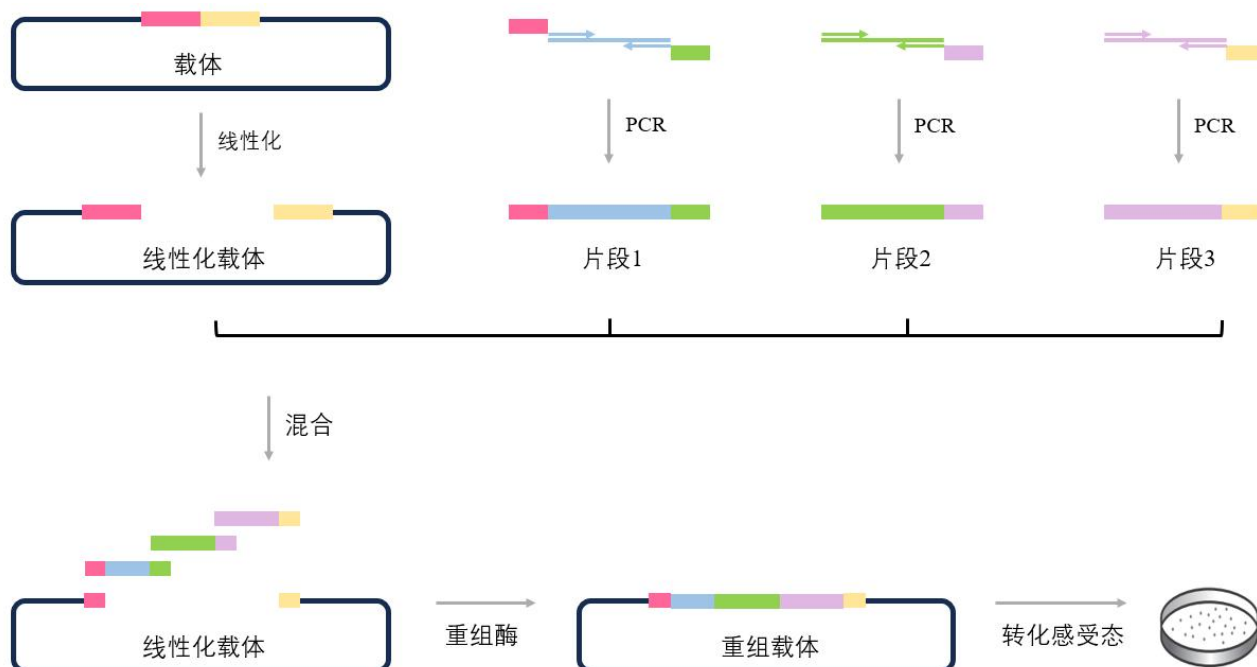
组分	规格 (50T)	货号
ClonPlus One Step Cloning Mix	250 μ L	500-201A
pUC19 Control Vector, Linearized (Amp ⁺ , 40 ng/ μ L)	5 μ L	500-201B
500 bp Control Fragment (20 ng/ μ L)	5 μ L	500-201C

储存条件

本产品需置于 -20℃ 中储存,使用时尽可能避免反复冻融。冰袋运输。

使用方法

一、实验流程概要



二、线性化载体制备

选择合适的克隆位点，对载体进行线性化。尽量选择无重复序列且克隆位点上下游 25 bp 区域内 GC 含量在 40%~60% 之间的位点进行克隆。载体的线性化可以通过酶切或反向 PCR 扩增完成，推荐使用酶切方法，简便快捷。

1. 限制性内切酶酶切

可进行单酶切或双酶切，推荐使用双酶切进行载体的线性化。可以适当延长酶切时间，使载体线性化完全，减少环状质粒残留，以降低转化背景（假阳性克隆）。

2. 反向 PCR 扩增

使用反向 PCR 扩增制备线性化载体时，推荐使用高保真 DNA 聚合酶进行载体扩增，以减少扩增过程中引入碱基突变。推荐使用预线性化质粒作为模板，以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。若以环状质粒为模板，PCR 产物需使用 Dpn I 对残留的环状质粒进行消化后再纯化回收。

三、目的片段获得

推荐使用高保真 DNA 聚合酶对目的片段进行扩增，以减少扩增过程中引入碱基突变。建议将 PCR 产物纯化后再进行同源重组反应。使用酶切法将载体线性化后，载体的两个末端均是黏性末端，即均有几个碱基突出来，在设计引物时，突出来的碱基可包含在引物中，也可不包含。或者整个酶切位点也可包含在引物中，也可不包含。

1. 单个片段的引物设计

正向引物：载体的上游末端**正链** 15~20 nt+目的片段的上游末端**正链** 18~25 nt (5'→3')

反向引物：目的片段的下游末端**互补链** 18~25 nt+载体的下游末端**互补链** 15~20 nt (3'→5')

注：将反向引物序列发送给引物供应商合成时，需发送 5'→3' 的序列。

举例：

线性化载体序列：5'-GCCAAATCTGCATCG-----TGCTAGAGCTGATTG-3'
3'-CGGTTTAGACGTAGC-----ACGATCTCGACTAAC-5'

目的片段序列：5'-CATACGCCCATCGGTGGA-----TATGGTCACCGACGTTAG-3'
3'-GTATGCGGGTAGCCACCT-----ATACCACTGGCTGCAATC-5'

正向引物设计：5'-GCCAAATCTGCATCGCATACGCCCATCGGTGGA-3'

反向引物设计：3'-ATACCACTGGCTGCAATCAGATCTCGACTAAC-5'

2. 多个片段的引物设计

左侧片段的正向引物：载体的上游末端**正链** 15~20 nt+左侧片段的上游末端**正链** 18~25 nt (5'→3')

左侧片段的反向引物：左侧片段的下游末端**互补链** 18~25 nt+中间片段的上游末端**互补链** 15~20 nt (3'→5')

中间片段的正向引物：左侧片段的下游末端**正链** 15~20 nt+中间片段的上游末端**正链** 18~25 nt (5'→3')

中间片段的反向引物：中间片段的下游末端**互补链** 18~25 nt+右侧片段的上游末端**互补链** 15~20 nt (3'→5')

右侧片段的正向引物：中间片段的下游末端**正链** 15~20 nt+右侧片段的上游末端**正链** 18~25 nt (5'→3')

右侧片段的反向引物：右侧片段的下游末端**互补链** 18~25 nt+载体的下游末端**互补链** 15~20 nt (3'→5')

注：将反向引物序列发送给引物供应商合成时，需发送 5'→3' 的序列。

举例：

线性化载体序列：5'-GCCAAATCTGCATCG-----TGCTAGAGCTGATTG-3'
 3'-CGGTTTAGACGTAGC-----ACGATCTCGACTAAC-5'

左侧片段序列：5'-GGCACTTACCCCAATCAT-----AAGGCCCTATATCCAATT-3'
 3'-CCGTGAATGGGGTTAGTA-----TTCCGGGATATAGGTTAA-5'

中间片段序列：5'-TATATGGCCATACGTAAT-----TTAACCCATGGTGGACCT-3'
 3'-ATATACCGGTATGCATTA-----AATTGGGTACCACTGGA-5'

右侧片段序列：5'-CATACGCCCATCGGTGGA-----TATGGTCACCGACGTTAG-3'
 3'-GTATGCGGGTAGCCACCT-----ATACCAGTGGCTGCAATC-5'

左侧片段的正向引物设计：5'-GCCAAATCTGCATCGGGCACTTACCCCAATCAT-3'

左侧片段的反向引物设计：3'-TTCCGGGATATAGGTTAAATATACCGGTATGCATTA-5'

中间片段的正向引物设计：5'-AAGGCCCTATATCCAATTATATGGCCATACGTAAT-3'

中间片段的反向引物设计：3'-AATTGGGTACCACTGGAATATGCGGGTAGCCACCT-5'

右侧片段的正向引物设计：5'-TTAACCCATGGTGGACCTCATACGCCCATCGGTGGA-3'

右侧片段的反向引物设计：3'-ATACCAGTGGCTGCAATCACGATCTCGACTAAC-5'

四、同源重组反应

1. 线性化载体和目的片段的使用量计算

线性化载体的使用量 (ng) = 0.02 × 线性化载体的碱基对数

单个片段的同源重组反应：目的片段的使用量 (ng) = 0.04 × 目的片段的碱基对数，若片段的长度大于载体的长度，则线性化载体和目的片段的使用量需互换。

多个片段的同源重组反应：各个目的片段的使用量 (ng) = 0.02 × 目的片段的碱基对数

注：无论是单个片段或多个片段的同源重组反应，片段的使用量至少是 10 ng，若按照上述公式计算得到的使用量低于 10 ng 时，直接使用 10 ng 即可。

2. 在冰上配制以下反应体系

组分	同源重组反应	阴性对照	阳性对照
ClonPlus One Step Cloning Mix	5 μL	5 μL	5 μL
线性化载体	X μL	X μL	1 μL
目的片段	Y μL	0 μL	1 μL
ddH ₂ O	补至 10 μL	补至 10 μL	3 μL

反应体系配制完成后，短暂离心，使用移液器轻轻吸打混匀（勿振荡）。

3. 进行同源重组反应

1~2 个目的片段的同源重组反应：50℃，5~15 min，反应完成后短暂离心，将反应液置于冰上冷却，然后转化。

3~5 个目的片段的同源重组反应：50℃，15~30 min，反应完成后短暂离心，将反应液置于冰上冷却，然后转化。

若载体的长度在 10 Kb 以上或片段的长度在 5 Kb 以上时，建议将反应程序设置为 50℃，30~45 min。

注：重组产物若不能立即用于转化，需储存于-20℃，建议 1 周内用于转化。

五、重组产物转化

1. 吸取 5~10 μL 重组产物与 100 μL 冰浴上解冻的化学感受态细胞轻轻混匀，冰上静置 30 min。
2. 42℃ 热激 45 s 后，迅速转移至冰上（该过程不要晃动），静置 2 min。
3. 加入 800 μL SOC 或 LB 液体培养基，吸打混匀，在 37℃ 摇床 200 rpm 摇 1 h。
4. 将全部液体培养基涂布在含有对应抗生素的 LB 固体培养基平板上，在 37℃ 培养箱中倒置培养 12~16 h。

六、阳性克隆鉴定

阳性克隆鉴定一般使用较多的方法就是菌落 PCR 法，即直接挑取单菌落至 10 μL ddH₂O 中混匀，吸取 1~2 μL 作为模板，然后使用载体上的序列作为正向引物/目的片段上的序列作为反向引物或目的片段上的序列作为正向引物/载体上的序列作为反向引物进行 PCR 扩增。

还有就是酶切法，即挑取单菌落至含有对应抗生素的 LB 液体培养基中过夜培养后，提取质粒进行酶切鉴定。

常见问题与解决方案

1. 平板上仅有少数克隆。

使用转化效率大于 10^8 cfu/ μg 的感受态细胞进行转化。

将线性化载体和目的片段的 PCR 产物进行凝胶回收纯化，纯化产物溶解在 ddH₂O 中。

2. 较多克隆不含目的片段。

增加限制性内切酶的使用量或延长酶切反应时间或胶回收纯化酶切产物。

3. 较多克隆含有不正确的目的片段。

优化 PCR 反应体系，提高特异性。

胶回收纯化 PCR 产物。

4. 较多克隆的菌落 PCR 无条带。

优化 PCR 反应体系和反应程序。