ClonExpress Ultra
One Step Cloning Kit V3

C117

Vazyme

使用说明书

Version 24.1

Vazyme

Contents

01/产品概述 02
02/产品组分 02
03/保存条件 02
04/适用范围 02
05/自备材料 02
06/实验原理与流程概要 03
06-1/实验流程概要 03
06-2/线性化载体制备 03
06-3/插入片段获得 04
07/实验流程 06
07-1/重组反应 06
07-2/重组产物转化 07
07-3/重组产物鉴定 07
08/常见问题与解决方案 07

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

01/产品概述

ClonExpress技术是一种简单、快速并且高效的DNA无缝克隆技术，可快速将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。使用任意方式将载体进行线性化，在插入片段正/反向扩增引物5'端引入线性化载体的末端序列，使得PCR产物5'和3'最末端分别带有和线性化载体两末端一致的序列(15 - 20 bp)。这种两端带有与载体末端一致序列的PCR产物和线性化载体按一定比例混合后，在重组酶的催化下，50℃反应5 - 30 min即可进行转化，完成定向克隆。

ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V3采用最新优化工艺，可以高效兼容1 - 11个DNA片段的同源重组。最新优化的2 × CE Mix V3，在保证了大载体、高低GC同源臂等复杂体系的高克隆成功率的同时，进一步显著提升了对DNA投入量的兼容性，极大地减轻了由于DNA片段浓度低导致克隆效率下降的困扰。

02/产品组分

组 分	C117-01 (20 rxns)	C117-02 (40 rxns)
2 × CE Mix V3	100 μl	2 × 100 μl
500 bp Control Insert (20 ng/μl)	5 μl	5 μl
pUC19 Control Vector, Linearized (50 ng/μl, Amp^+)	5 μl	5 μl

03/保存条件

-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

04/适用范围

◇ 快速克隆

◇ 高通量克隆

◇ 无缝克隆

◇ DNA定点突变

05/自备材料

片段扩增所需模板、引物；线性化载体。

高保真聚合酶：2 × Phanta Max Master Mix (Vazyme #P515)或其他等效产品。

感受态细胞：克隆菌株制备的化学感受态细胞，推荐使用DH5α Competent Cell (Vazyme #C502) 、Fast-T1 Competent Cell (Vazyme #C505)。

其他材料：ddH_2O、PCR管、PCR仪等。

06/实验原理与流程概要

06-1/实验流程概要

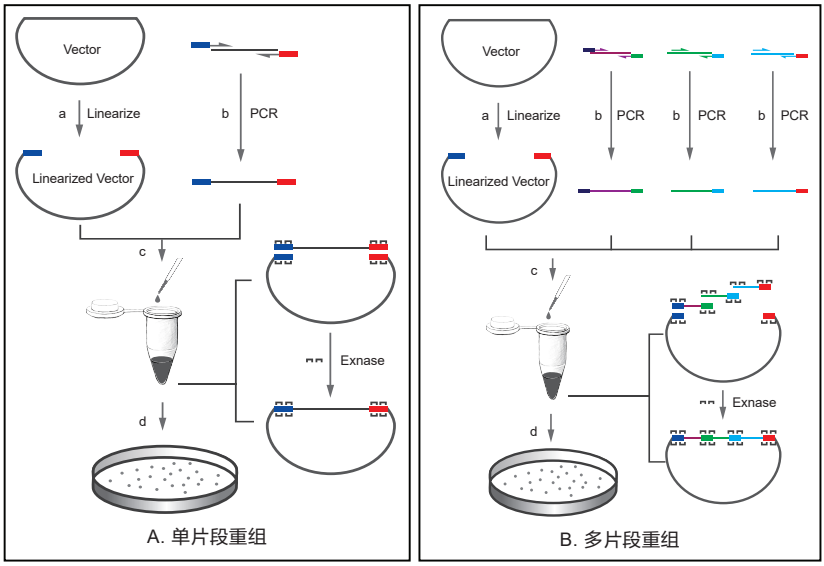


Fig 1. ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V3同源重组原理图

a. 线性化载体制备：通过酶切或反向PCR获得线性化载体。

b. 插入片段获得：由PCR制备，所用扩增引物在设计时需在其5'端添加同源序列(图中以深蓝色、绿色、浅蓝色和红色标记)，使得扩增产物之间以及扩增产物与线性化载体之间各有15 - 20 bp的同源序列。

c. 重组反应：将线性化载体和各插入片段按比例混合，在Exnase (2 × CE Mix V3)催化下，50℃反应5 - 30 min即可完成重组反应，实现多个线性化DNA的体外环化。

d. 转化感受态细胞：重组产物直接进行转化，平板上会形成数百个单克隆供后期阳性筛选。

06-2/线性化载体制备

1. 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载体克隆位点上下游20 bp区域内GC含量在40% - 60%之间的位点进行克隆。

2. 载体线性化方式：可以选择限制性内切酶酶切消化，或反向PCR扩增。

◇ 酶切制备线性化载体时，推荐使用双酶切方法(推荐Vazyme #C401 - C420)使载体线性化完全，单酶切线性化次之。限制性内切酶酶切消化，请适当延长酶切时间，以减少环状质粒残留，降低转化背景(假阳性克隆)。

◇ 反向PCR扩增制备线性化载体时，推荐使用高保真聚合酶2 × Phanta Max Master Mix (Vazyme #P515)进行载体扩增，以减少扩增突变的引入。50 μl的PCR体系中，推荐使用0.1 - 1 ng环状质粒模板，或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。

▲ 以环状质粒为模板时，PCR产物需使用*Dpn* I进行消化后纯化回收，以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。

06-3/插入片段获得

插入片段可用任意PCR酶(Taq酶或高保真酶)扩增，无需考虑产物末端有无A尾(重组过程中将被去除，在最终载体中不会出现)。但为了减少扩增突变的引入，推荐使用高保真聚合酶2 × Phanta Max Master Mix (Vazyme #P515)进行扩增。

1. 单片段同源重组引物设计的总原则：在插入片段正反向扩增引物的5'端引入线性化载体两末端同源序列，使扩增后的插入片段5'和3'最末端分别带有和线性化克隆载体两末端对应一致的同源序列(15 - 20 bp，不包括酶切位点)。

   插入片段正向扩增引物设计方式为：

   5'-上游载体末端同源序列 + 酶切位点(可保留或删除) + 基因特异性正向扩增引物序列-3'

   插入片段反向扩增引物设计方式为：

   5'-下游载体末端同源序列 + 酶切位点(可保留或删除) + 基因特异性反向扩增引物序列-3'

   ▲ 基因特异性正/反向扩增引物序列即常规插入片段正/反向扩增引物序列，Tm值60 ~ 65℃为佳；

   ▲ 上/下游载体末端同源序列即线性化载体最末端序列(用于同源重组)，GC含量40% - 60%为佳。

   推荐登陆诺唯赞官网使用在线引物设计软件CE Design(http://www.vazyme.com)，自动生成插入片段的扩增引物。若手动设计，可参照以下实例：



Fig 2. 单片段扩增引物设计方案

▲ 如果最终引物长度超过40 bp，推荐在引物合成时选用PAGE纯化，可提高克隆成功率。

2. 多片段同源重组引物设计的总原则：通过在引物5'端引入同源序列，使扩增产物之间以及扩增产物与线性化克隆载体之间都具有能够相互同源重组的完全一致的序列(15 - 20 bp，不包括酶切位点)。

推荐登陆诺唯赞官网使用在线引物设计软件CE Design(http://www.vazyme.com)，自动生成插入片段的扩增引物。若手动设计，可参照以下实例：

引物具体设计方案如下：

其中，两侧片段与载体重组端的引物设计方式为：

最上游片段正向扩增引物：

5'-上游载体末端同源序列 + 酶切位点(可保留或删除) + 基因特异性正向扩增引物序列-3'

最下游片段反向扩增引物：

5'-下游载体末端同源序列 + 酶切位点(可保留或删除) + 基因特异性反向扩增引物序列-3'

▲ 基因特异性正/反向扩增引物序列即常规插入片段正/反向扩增引物序列，Tm值60 ~ 65℃为佳；

▲ 上/下游载体末端同源序列即线性化载体最末端序列(用于同源重组)，GC含量40% - 60%为佳。

◇ 中间各插入片段之间的引物设计方式有以下三种：

a. 以前一片段3'端15 - 20 bp作为同源序列添加至后一片段5'端；

b. 以后一片段5'端15 - 20 bp作为同源序列添加至前一片段3'端(如Fig 3所示)；

c. 两片段各取一部分作为同源序列(总计15 - 20 bp)，分别添加至另一片段末端。

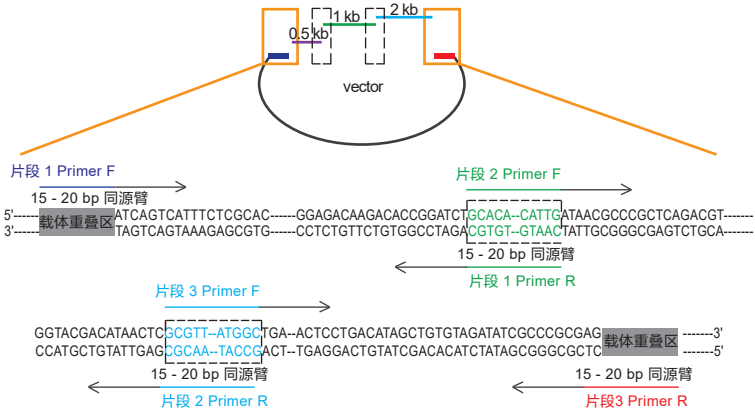


Fig 3. 多片段扩增引物设计方案

▲ 两侧片段与载体重组端的引物设计(参考Fig 2. 单片段扩增引物设计方案)。

▲ 如果最终引物长度超过40 bp，推荐在引物合成时选用PAGE纯化，可提高克隆成功率。

07/实验流程

07-1/重组反应

1. 线性化载体和插入片段浓度测定

   若线性化载体与插入片段已通过高质量的试剂盒进行胶回收纯化，且经电泳检测无明显杂带或Smear残留时，可使用Onedrop等基于吸光值的仪器进行浓度测定，但只有当A_{260}/A_{280}在1.8 - 2.0之间时浓度值可信。推荐使用Nanodrop、Onedrop、Qubit、PicoGreen等进行浓度测定。当样品浓度低于10 ng时，不同型号的仪器基于A_{260}得到的浓度值可能存在较大差异。

2. 载体、片段使用量计算：

   本产品可兼容0.003 - 0.25 pmol的载体与片段的投入量。对于单片段同源重组反应，最适克隆载体使用量为0.03 pmol，最适插入片段使用量为0.06 pmol(载体与插入片段摩尔比为1:2)；对于多片段同源重组反应，最适DNA使用量为每个片段(包括线性化载体)各0.03 pmol(载体与插入片段摩尔比为1:1)。

   这些摩尔数对应的DNA质量可由以下公式粗略计算获得：

◇ **对于单片段同源重组反应：**

最适克隆载体使用量 = [0.02 × 克隆载体碱基对数] ng(0.03 pmol)

最适插入片段使用量 = [0.04 × 插入片段碱基对数] ng(0.06 pmol)

◇ **对于多片段同源重组反应：**

最适克隆载体使用量 = [0.02 × 克隆载体碱基对数] ng(0.03 pmol)

每个片段的最适使用量 = [0.02 × 每个片段碱基对数] ng(0.03 pmol)

▲ 推荐载体与插入片段的使用量分别在10 - 100 ng内，当使用上述公式计算最适使用量低于或超过这个范围时，直接使用最低/最高投入量即可。

▲ 对于单片段同源重组反应，当插入片段长度＞克隆载体时，最适克隆载体与插入片段使用量的计算方式应互换，即将插入片段当做克隆载体，克隆载体当做插入片段进行计算。

▲ 对于单片段同源重组反应，PCR产物无非特异性扩增条带时，可不进行DNA纯化直接使用，加入总体积应不超过反应体系体积的1/5，即2 μl，但重组效率会降低，推荐纯化后进行重组。

3. 于冰上配制以下反应体系：

组分	重组反应	阴性对照-1[b]	阴性对照-2[c]	阳性对照[d]
线性化载体[a]	X μl	X μl	0 μl	1 μl
n个插入片段[a](n≤10)	$Y_1+Y_2…+Y_n$ μl	0 μl	$Y_1+Y_2…+Y_n$ μl	1 μl
2 × CE Mix V3	5 μl	0 μl	0 μl	5 μl
ddH_2O	to 10 μl	to 10 μl	to 10 μl	to 10 μl

a. X/Y根据公式计算得到载体用量和各插入片段用量。为了确保加样的准确性，在配制重组反应体系前可将线性化载体与插入片段适当稀释，各组分加样量不低于1 μl。

b. 阴性对照-1可用来确认线性化克隆载体中有无环状质粒残留，推荐进行。

c. 阴性对照-2当插入片段扩增模板是与克隆载体抗性相同的环状质粒时，推荐进行。建议将线性化载体与插入片段的环状质粒残留检测独立进行。

d. 阳性对照反应可用来排除其他实验材料及操作因素的影响。

4. 使用移液器轻轻吸打混匀(请勿振荡混匀)，短暂离心将反应液收集至管底。
5. 单片段重组反应，50℃，5 - 15 min；降至4℃或立即置于冰上冷却；
   多片段重组反应，50℃，15 - 30 min；降至4℃或立即置于冰上冷却。
   ▲ 推荐在PCR仪等温控比较精确的仪器上进行反应。
   ▲ 当插入片段>5时，建议反应时间延长至30 min。
   ▲ 本产品可兼容0.003 - 0.25 pmol的载体与片段的投入量，所以当载体和插入片段总体积>5 μl时，可适当降低投入量，但注意反应时间不要超过推荐时间。
   ▲ 重组产物可于-20℃存放一周，待需要时解冻转化即可。

07-2/重组产物转化

1. 将克隆用的化学感受态细胞置于冰上解冻(如：Fast-T1 Competent Cell (Vazyme #C505))。
2. 取5 - 10 μl重组产物加入到100 μl感受态细胞中，轻弹管壁混匀(请勿振荡混匀)，冰上静置30 min。
   ▲ 重组产物转化体积最多不应超过所用感受态细胞体积的1/10；
3. 42℃水浴热激30 sec后，立即置于冰上冷却2 - 3 min。
4. 加入900 μl SOC或LB液体培养基(不添加抗生素)，37℃摇菌1 h(转速200 - 250 rpm)。
5. 将相应抗性的LB固体培养基平板在37℃培养箱中预热。
6. 5,000 rpm (2,500 × g)离心5 min，弃掉900 μl上清。用剩余培养基将菌体重悬，用无菌涂布棒在含有正确抗性的平板上轻轻涂匀。
7. 37℃培养箱中倒置培养12 - 16 h。

07-3/重组产物鉴定

① 菌落PCR法：挑单克隆至10 μl ddH_2O混匀作为模板；使用合适的正、反向引物进行菌落PCR鉴定。
   ▲ 扩增引物至少使用一条载体上的引物。

② 酶切法：挑取单菌落至合适抗性的液体培养基中过夜培养后，提取质粒进行酶切鉴定。

③ 测序鉴定：使用载体上合适引物测序，进行测序分析。

08/常见问题与解决方案

◇ 引物如何设计？

① 引物设计：推荐引物设计软件CE Design，选择相应模块进行设计。

② 引物三部分：同源臂(15 - 20 bp，不计算酶切位点和残留碱基，GC含量40% - 60%) + 酶切点(根据实验需求保留或者删除) + 特异性引物(引物Tm值的计算不包括同源臂的序列)。

◇ 平板上未长出克隆或克隆数目很少。

① 引物设计不正确：引物包含15 - 20 bp同源臂(不计算酶切位点)，GC含量40% - 60%。

② 线性化克隆载体和插入片段扩增产物的使用量不足/过量，或者比例不佳：尽量按照说明书中推荐的量和比例配制重组反应体系。

③ 载体和插入片段不纯，抑制反应：未纯化DNA使用体积不应超过2 μl(反应体系体积的1/5)；建议线性化载体、PCR产物进行凝胶回收纯化，纯化产物溶解在ddH_2O中。

④ 感受态细胞效率低：感受态细胞的转化效率需>10^8 cfu/μg。可进行简单检测，转化0.1 ng质粒，取1/10进行涂板，生长1,000个菌斑，估算转化效率为10^8 cfu/μg；重组产物的转化体积不应超过感受态细胞体积的1/10，否则会降低转化效率；选择克隆用感受态细胞(如Fast-T1/DH5α)，不能选择表达感受态细胞。

◇ 多数克隆不含插入片段或含有不正确的插入片段。

① PCR产物混有非特异扩增产物：优化PCR体系，提高特异性；胶回收PCR产物；鉴定更多的克隆。

② 克隆载体线性化不完全：可通过阴性对照检测载体是否线性化完全，优化酶切体系，提高限制性内切酶使用量、延长酶切反应时间、胶回收纯化酶切产物。

③ 反应体系中混入了相同抗性的质粒：PCR扩增模板为环状质粒时，如扩增产物未纯化直接用于重组反应时推荐*Dpn I* 消化(推荐SwiftCut Dpn I，Vazyme #C404)，或者对扩增产物进行胶回收纯化。

◇ 菌落PCR无条带。

① 引物不正确：推荐使用载体的通用引物进行菌检，或至少使用一条通用引物。

② PCR体系或程序不合适：没有目的条带也没有空质粒条带，建议优化PCR体系、程序；或者提取质粒，以质粒做模板PCR验证；或者进行酶切验证。

③ 重组失败：只有空质粒的条带，说明重组不成功，载体线性化不完全，建议优化酶切体系。

Vazyme Biotech Co.,Ltd.
www.vazyme.com
400-600-9335 (China) +86 400-168-5000 (Global)
support@vazyme.com

www.vazyme.com