

版本号: VI160407

EasyGeno快速重组克隆试剂盒

EasyGeno Assembly Cloning kit

目录号: VI201

产品内容

产品组成	VI201-01 (10 rxn)	VI201-02 (20 rxn)
2 × EasyGeno组装混合液 2 × EasyGeno Assembly Mix	50 μl	2 × 50 μl
pUC19线性化对照载体(50 ng/μl) pUC19 Control Vector, linearized (50 ng/μl)	10 μl	10 μl
2 kb平末端对照片段(50 ng/μl) 2 kb Control Blunt Insert (50 ng/μl)	10 μl	10 μl
双蒸水 ddH ₂ O	1 ml	2 × 1 ml

储存条件

请将试剂盒置于-20°C保存, 避免反复冻融。保质期为一年。

产品简介

EasyGeno重组克隆试剂盒基于DNA序列同源性进行片段重组，可快速将单个或多个片段定向克隆到任意线性化载体中。通过精心设计和严格试验，本试剂盒含有的2×EasyGeno Assembly Mix具有的酶活性可将载体和片段的同源区域从双链的3'端进行重组连接，最终得到的无缺口闭环质粒可直接转化感受态细胞筛选克隆。该方案克服了酶切位点的限制，仅需在插入片段PCR引物5'端引入线性化载体的末端序列，使得插入片段5'和3'两端带有载体两端的一致性序列(15-25 bp)，既可实现插入片段的定向重组进入载体，并可实现多插入片段同时定向重组进入载体。重组反应可在恒温条件下快速进行(50 °C处理15 min)，配合灵活的PCR产物处理方式和快速转化方法，数小时内即可完成从DNA样品准备到重组产物的转化涂板培养的全部操作。

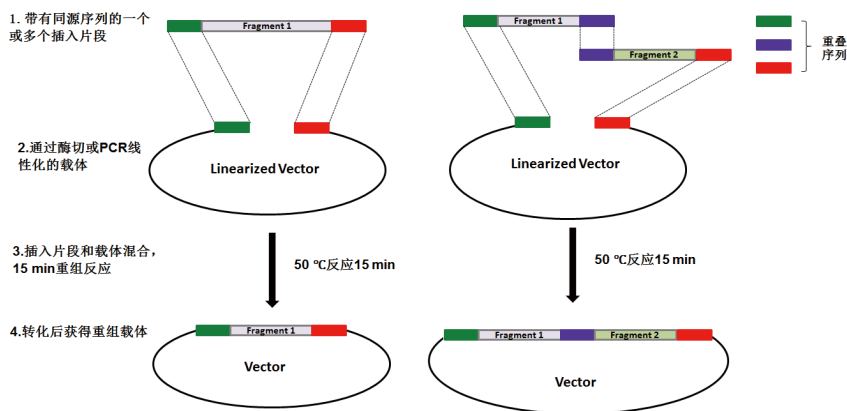


图1. EasyGeno重组克隆试剂盒原理图

产品特点

1. 无需考虑酶切位点限制，通过序列同源性15 min实现载体与片段的快速重组。
2. 插入片段的PCR产物正确且单一，无需纯化，可直接与载体进行重组反应。
3. 一步反应实现1-5个插入片段的定向重组进入任意载体。
4. 基于同源重组原理的片段连接，更适合于高通量的载体构建。
5. 可以选择性进行5 min快速转化*E. coli*感受态细胞。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

1. 对于单个片段的PCR产物进行重组时，如果PCR条带单一，可以直接进行重组反应，加入体积不要超过重组体系的20%，重组效率要低于使用纯化后的PCR产物进行重组。
2. 对于多个片段的重组反应，重组效率要低于单个片段的重组效率，建议胶回收纯化后再进行重组反应。
3. 如果想保留酶切位点进行后续的鉴定，建议增加缺失的酶切位点序列。

操作步骤

1. 线性化载体的制备

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的线性化，然后通过胶回收的方法回收纯化载体。对于以质粒模板进行扩增的PCR产物，建议使用Dpn I 内切酶消化残存的质粒模板。

2. PCR产物的准备

PCR产物的扩增建议使用高保真性聚合酶，如pfu DNA polymerase (EP101)，Fast HiFidelity PCR Kit (KP202)等。

(1) 进行单个插入片段克隆的引物设计原则

线性化载体的末端可以是酶切得到的平末端（图2a）、3'突出末端或5'突出末端（图2b），或者是PCR得到的平端类型（图2a）。在引物设计时，遵循的原则是同源区域的选择与载体的3'末端序列对齐为准，例如，酶切位点产生得到5'突出末端，以另外一条链3'端得到的序列开始计算出15 nt的长度作为同源序列。正向引物为与载体左臂重叠区域（15-25 nt）加上基因插入片段正向序列（22 nt左右），反向引物为与载体右臂重叠区域（15-25 nt）加上基因插入片段反向序列（22 nt左右）。

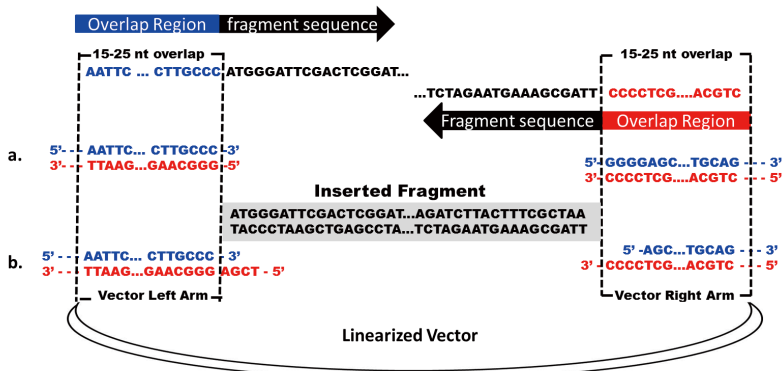


图2. 单个插入片段重组克隆的引物设计原则

(2) 进行多个片段克隆的引物设计原则

载体两端的引物设计原则与进行单个PCR产物克隆时的设计原则相同，片段之间重叠区域引物设计原则如图3，Fragment 1的反向引物和Fragment 2的正向引物有15-25 nt的重叠区域，Fragment 1的反向引物包括重叠区域A和反向的特异引物区域，Fragment 2的正向引物包括重叠区域A和正向的特异引物区域，依此类推。

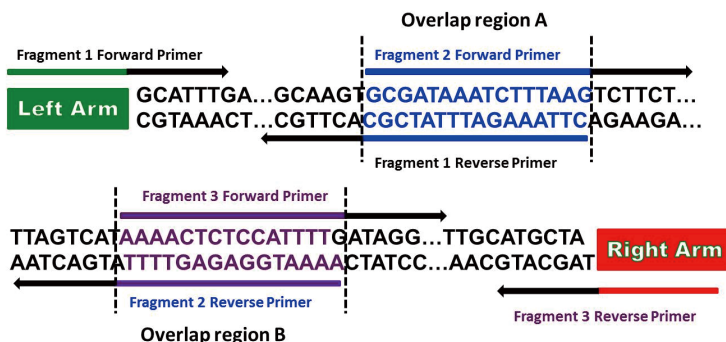


图3. 多个片段重组克隆的引物设计原则

(3) 使用在线引物设计工具EasyGeno Primer设计引物

EasyGeno Primer是为配合EasyGeno快速重组克隆试剂盒（VI201）的使用所开发的专用引物设计工具。该软件适用于通过EasyGeno技术进行单片段和多片段定向构建进入载体时的目的DNA片段的PCR扩增引物设计。

登录TIANGEN官网主页，点击  进入EasyGeno Primer.

3. 重组反应体系的建立

(1) 将下列混合物小心加到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离入管底）。

组成成分	用量	阴性对照	阳性对照
线性化载体	0.01-0.25 pmol *	0.01-0.25 pmol	pUC19 Control Vector, linearized, 1 μ l
插入片段	0.01-0.25 pmol**	0.05-0.5 pmol	2 kb Control Blunt Insert, 2 μ l
2 \times EasyGeno Assembly Mix	5 μ l***	---	5 μ l***
ddH ₂ O	补足到10 μ l	补足至10 μ l	补足至10 μ l

pmol =质量ng/ (片段长度 bp \times 0.65 kDa)

* 载体建议使用量在50-100 ng之间。

** 载体与各个片段的摩尔比例建议在1:2-1:3之间。如果使用未纯化的PCR产物，10 μ l 反应体系中建议加入不超过2 μ l体积。

***重组反应体系建立时，为保证更高的重组效率，建议加入线性化载体和插入片段后，加入2 \times EasyGeno Assembly Mix。

(2) 将混合反应液置于50 $^{\circ}$ C反应15 min（对于超过3个以上片段的重组，引物中重叠序列的长度建议 \geq 20 nt，反应时间延长至60 min）。反应结束后，瞬时离心后将离心管置于冰上冷却，进行后续的转化反应。

4. 转化(以下的步骤请在无菌条件下操作)

(1) 普通转化流程

1) 取DH5 α 、TOP10或T-Fast感受态细胞置于冰浴中，如需分装可将刚融化细胞悬液分装到无菌预冷的离心管中，置于冰浴中。

注意：一次转化感受态细胞的建议用量为50-100 μ l，可以根据实际情况分装使用。

-
- 2) 向感受态细胞悬液中加入5-10 μl 重组产物（100 μl 的感受态细胞能够被1 ng超螺旋质粒DNA所饱和），轻弹混匀，在冰浴中静置30 min。

注意：所用DNA体积不要超过感受态细胞悬液体积的十分之一。以下实验以50 μl 感受态细胞为例。

- 3) 将离心管置于42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置60-90 sec，然后快速将管转移到冰浴中，使细胞冷却2-3 min，该过程不要摇动离心管。
- 4) 向每个离心管中加入350 μl 无菌的SOC或LB培养基（不含抗生素），混匀后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床振荡培养45 min（180 rpm），目的是使质粒上相关的抗性标记基因表达，使菌体复苏。
- 5) 将转化体系混匀，吸取100 μl 已转化的感受态细胞加到含相应抗生素的SOB或LB固体琼脂培养基上，用无菌的平板涂布玻璃珠（GB101）或涂布棒轻轻的将细胞均匀涂开。将平板置于室温直至液体被吸收，倒置平板，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养12-16 h。

注意：如若基于以往经验克隆数较少，可将菌液4000 rpm离心10 min收集菌体，弃去培养基，加入100-200 μl 的SOC或LB培养基重悬菌体，并转移至含相应抗生素的SOB或LB固体琼脂培养基上均匀涂开。

感受态菌落的生长速度取决于菌株的种类、所转化质粒的种类及所携带的抗性基因。

（2）快速转化流程

- 1) 取T-Fast感受态细胞置于冰浴中，如需分装可将刚融化细胞悬液分装到无菌预冷的离心管中，置于冰浴中。

注意：一次转化感受态细胞的建议用量为50-100 μl ，可以根据实际情况分装使用。

- 2) 待感受态完全融化以后，向感受态细胞悬液中加入5-10 μl 重组产物（100 μl 的感受态细胞能够被1 ng超螺旋质粒DNA所饱和），轻轻混匀，不要涡旋，并在冰浴中静置2 min。

注意：所用DNA体积不要超过感受态细胞悬液体积的十分之一。以下实验以100 μl 感受态细胞为例。

- 3) 将转化体系于42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中放置90 sec，然后快速将管转移到冰浴中，使细胞冷却2 min，该过程不要摇动离心管。

4) 向转化体系中加入200 μ l 无菌的SOC或LB培养基 (不含抗生素) 混匀。混匀后, 吸取200 μ l 已转化的感受态细胞直接加到含相应抗生素的SOB或LB固体琼脂培养基上, 用无菌的平板涂布玻璃珠 (GB101) 或涂布棒轻轻的将细胞均匀涂开。将平板置于室温直至液体被吸收, 倒置平板, 37 $^{\circ}$ C 培养6~9 h。

注意: 对于氨苄青霉素抗性的载体, 混匀后直接涂板。对于硫酸卡那霉素抗性或其他抗性的载体, 37 $^{\circ}$ C 摇床中180 rpm振荡培养45~60 min后, 吸取100-200 μ l进行涂板。

检测

1. 常规检测: 将得到的菌落接种1-5 ml LB (含有相应浓度抗生素) 培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养过夜, 保存菌种后提取质粒, 应用PCR或酶切方法鉴定插入片段是否正确。

Control Insert DNA的PCR鉴定, 请参考以下反应条件:

95 $^{\circ}$ C 2 min	} 30 cycles
94 $^{\circ}$ C 30 sec	
55-65 $^{\circ}$ C 30 sec	
72 $^{\circ}$ C 1 kb/min	
72 $^{\circ}$ C 5 min	
4 $^{\circ}$ C ∞	

注意: 检测引物的退火温度基于引物自身序列而定, 并建议使用载体引物进行检测, PCR延伸时间建议1 kb/min。

- 快速检测: 挑取菌落直接进行PCR检测 (具体方法见分子克隆第三版)。
- 测序鉴定: 使用常规或快速方法进行初步的鉴定后进行序列的测定。

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品