

版本号: VI230630

# EasyGeno Single Assembly Cloning kit

## EasyGeno 单片段重组克隆试剂盒

目录号: VI202

### 产品内容

产品组成	VI202-02 (20 rxn)
2×EasyGeno单片段组装混合液 2×EasyGeno Single Assembly Mix	2×50 μl
pUC19线性化对照载体 (50 ng/μl) Linearized pUC19 Control (50 ng/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
双蒸水 ddH <sub>2</sub> O	2×1 ml

### 储存条件

请将试剂盒置于-30~-15℃保存，避免反复冻融。保质期为一年。

## 产品简介

EasyGeno单片段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 Single 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），即可实现插入片段的定向重组进入载体。重组反应可在恒温条件下快速进行（50℃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。

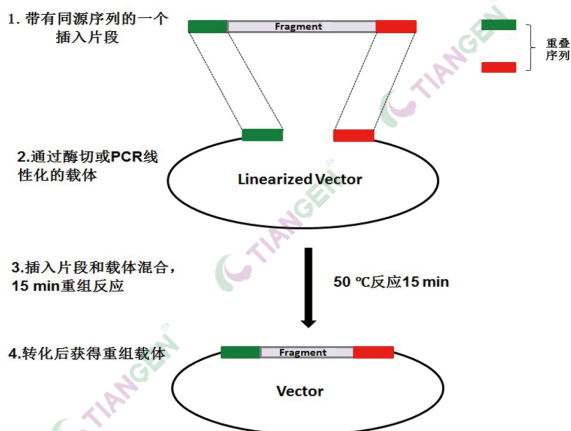


图1. EasyGeno单片段重组克隆试剂盒原理图

## 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. 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. 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)等。

#### (1) 进行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序列的选择与载体的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）。

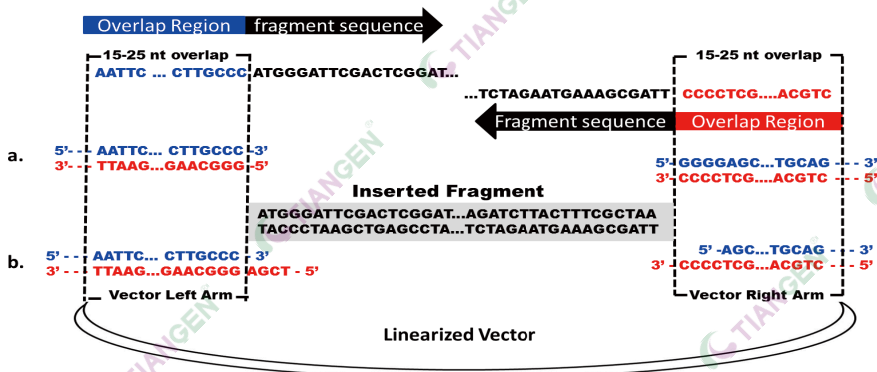


图2. 插入片段重组克隆的引物设计原则

## (2) 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）及EasyGeno单片段重组克隆试剂盒（VI202）的使用所开发出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	Linearized pUC19 Control, 1 $\mu$ l
插入片段	0.01-0.25 pmol**	0.05-0.5 pmol	2 kb Control Blunt Insert, 2 $\mu$ l
2×EasyGeno Single Assembly Mix	5 $\mu$ l***	---	5 $\mu$ l***
ddH <sub>2</sub> O	补足到10 $\mu$ l	补足至10 $\mu$ l	补足至10 $\mu$ l

pmol = 质量ng / (片段长度 bp × 0.65 kDa)

\* 载体建议使用量在50 -100 ng之间。

\*\* 载体与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  $\mu$ l反应体系中建议加入不超过2  $\mu$ 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×EasyGeno Single Assembly Mix。

(2) 将混合反应液置于50 °C反应15 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 $\alpha$ 、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  $\mu$ 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  $\mu\text{l}$ 重组产物（100  $\mu\text{l}$ 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  $\mu\text{l}$ 感受态细胞为例。**

- 3) 将离心管置于42°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  $\mu\text{l}$ 无菌的SOC或LB培养基(不含抗生素)，混匀后置于37°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  $\mu\text{l}$ 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°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  $\mu\text{l}$ 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  $\mu\text{l}$ ，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  $\mu\text{l}$ 重组产物（100  $\mu\text{l}$ 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  $\mu\text{l}$ 感受态细胞为例。**

- 3) 将转化体系于42°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  $\mu\text{l}$  无菌的SOC或LB培养基（不含抗生素）混匀。混匀后，吸取200  $\mu\text{l}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中180 rpm振荡培养45-60 min后，吸取100-200  $\mu\text{l}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 2 min	} 30 cycles
94 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec	
55-65 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec	
72 $^{\circ}\text{C}$ 1 kb/min	
72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	
4 $^{\circ}\text{C}$ $\infty$	

**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。**

2. 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）。

3. 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。



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

# 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