

EZ-Assembly One-Step Cloning Kit

说明书

Cat. No.: EZ1101

一、产品简介

EZ-Assembly One-Step Cloning Kit 是一款高效的一步法无缝克隆试剂盒，可通过单个反应将一个 DNA 片段插入到任何载体的任何位点，不产生多余的碱基序列。本试剂盒操作简单，只需制备线性化载体和扩增含有载体末端同源序列（15~20 bp）的插入片段，将两者按照一定比例混合，加入 2× Fusion Mix，50°C 反应 5 min 即可进行转化，完成定向克隆。

试剂盒中的 2× Fusion Mix 含同源重组酶及高度优化的缓冲液体系，具有很高的重组效率和克隆成功率。

二、产品组分

组分 \ 货号 (规格)	EZ1101-01 (5 Rxns)	EZ1101-02 (20 Rxns)	EZ1101-03 (40 Rxns)
2× Fusion Mix*1	55 µl	220 µl	440 µl

注：*1. 包含同源重组酶及高度优化的缓冲液体系。

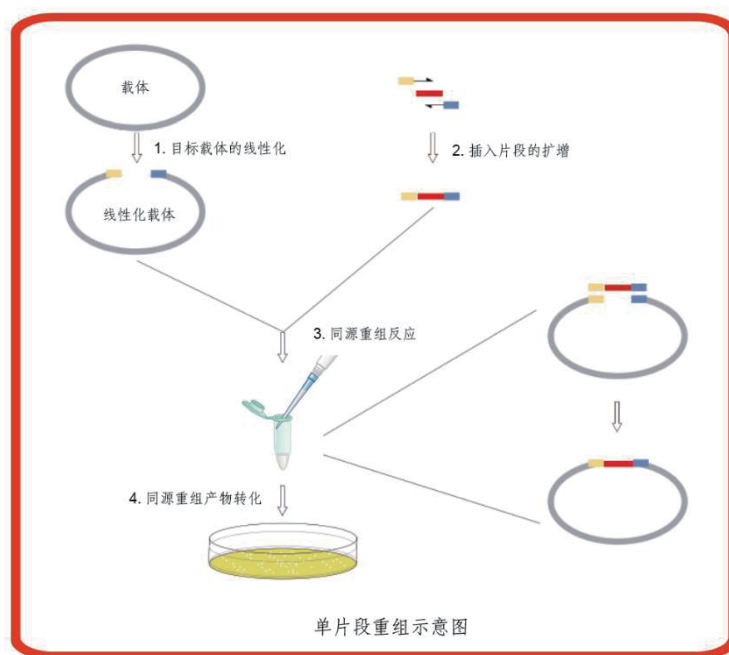
三、保存条件

本产品建议置于-20°C 保存。过期日期详见产品标签中有效期信息。

四、自备材料

片段扩增所需模板及引物、线性化载体、高保真酶、感受态细胞（如 DH5α Competent cell）、ddH₂O、PCR 管、PCR 仪等。

五、实验流程



1. 目标载体的线性化：通过酶切或反向 PCR 获得线性化载体。
2. 插入片段的扩增：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（图中以黄色和蓝色标记），使得扩增产物与线性化载体之间具有 15 ~ 20 bp 的同源序列。
3. 同源重组反应：将线性化载体和插入片段按比例混合，50°C 反应 5 min 即可完成重组反应。
4. 同源重组产物转化：同源重组产物直接进行转化，平板上会形成单克隆供后期阳性克隆检测。

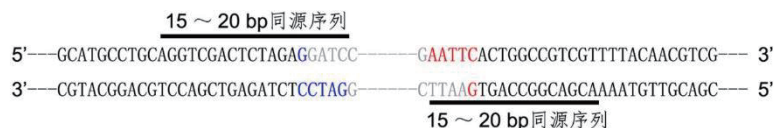
六、操作步骤

1. 目标载体的线性化：可通过限制性内切酶酶切或反向 PCR 扩增线性化目标载体。
 - a. 限制性内切酶法：在目标载体上选择合适的酶切位点进行双酶切或单酶切，并对酶切后的载体进行胶回收。建议载体线性化使用双酶切的方法。单酶切容易造成载体自连，导致假阳性。
 - b. 反向 PCR 扩增法：在目的基因插入载体位点的左右两侧，设计方向相反的引物（约 20 bp）进行 PCR 扩增和胶回收，以获得线性化的载体片段。
2. 插入片段的扩增：设计插入片段的扩增引物，使用高保真酶进行 PCR 扩增并对产物进行胶回收，获得含有载体末端同源序列的目的基因。

插入片段的引物设计方法（示例图）：在插入片段特异性扩增引物的 5'端添加 15 ~ 20 bp 的载体末端同源序列。特异性扩增引物即为普通 PCR 引物，序列长度为 18 ~ 25 bp，GC 含量 40% ~ 60%，T_m 值 55 ~ 65°C，引物之间避

免形成二聚体或发夹结构。引物长度超过 40 bp，建议选用 PAGE 纯化，可提高克隆成功率。

载体通过双酶切线性化（例如 *Bam*H I 和 *Eco*R I，蓝色和红色分别表示 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切后形成的末端）



插入片段的扩增引物为：

Primer F: 5' AGGTCGACTCTAGAGGATCCAGGTGGTGAACCTGGACACC 3'

Primer R: 5' ACGACGGCCAGTGAATTCCTCTTTTGACCCAGCCTGTGAC 3'

示例图：插入片段的引物设计方法

3. 同源重组反应：

① 使用前混匀 2× Fusion Mix，于冰上配制同源重组反应体系：

组分	单片段重组反应	阴性对照
载体与插入片段的摩尔比	1:2	-
线性化载体 (μl)	X	X
插入片段 (μl)	Y	0
2× Fusion Mix (μl)	10	10
ddH ₂ O (μl)	补足到 20	补足到 20

载体用量和插入片段可参考下列用量：

- 插入单个片段的同源重组反应，载体与插入片段摩尔比为 1:2 时，重组效率最高。
- 线性化载体的使用量应在 50 ~ 200 ng 之间；插入片段的使用量应在 10 ~ 100 ng 之间。

② 使用移液器轻轻吹打混匀上述配置好的反应体系，短暂离心至管底。

③ 将反应体系置于 50°C 反应 5 min，反应结束后立即放在冰上。

④ 将同源重组产物转化大肠杆菌感受态；如不能立即进行后续操作，可将样品保存于 -20°C。

4. 同源重组产物转化：

① -80°C 冰箱中取 100 μl 感受态细胞悬液（如 DH5α Competent cell），室温（15 ~ 25°C）下使其解冻，解冻后立即置冰上。

② 加入同源重组产物 10 μl，轻轻摇匀，冰上放置 30 min。

③ 42°C 水浴中热击 90 sec，热击后迅速置于冰上冷却 3 min。

④ 向管中加入 1 ml 无抗 LB 液体培养基，混匀后 37°C 振荡培养 1 h，使细菌恢复正常生长状态。

⑤ 将上述菌液 2500 g（5000 rpm）离心 5 min，弃掉 900 μl 上清。用剩余 100 μl 培养基将菌体重悬。

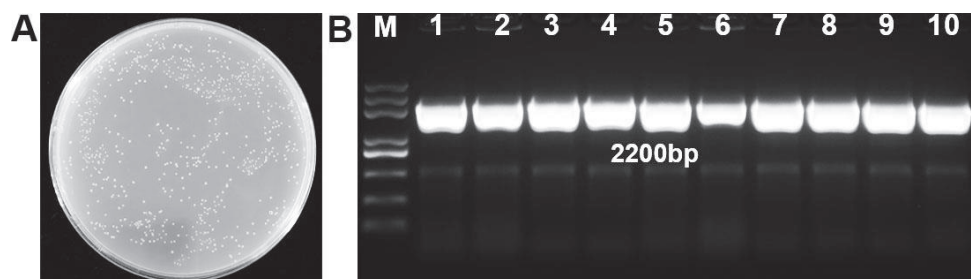
⑥ 涂布于含有相应抗性的固体培养基上，晾干。

⑦ 37°C 培养箱中倒置培养 16 ~ 24 h。

⑧ 阳性克隆检测：挑取单克隆进行菌落 PCR 或者提取质粒进行酶切鉴定，也可以直接选取数个克隆进行测序鉴定。

七、代表性实验结果

使用 EZ-Assembly One-Step Cloning Kit 进行插入一个片段的同源重组反应及后续的大肠杆菌转化，得到结果如下图。可以看出，本试剂盒具有很高的重组效率以及克隆成功率。



A. 插入一个片段的重组产物转化平板。载体 pGADT7 (8.0 kb) 通过 *ECOR* I 和 *Bam*H I 双酶切线性化，插入一个 2200 bp 的片段，线性化载体与插入片段的摩尔比为 1:2，50°C 反应 5 min。

B. 插入一个片段的菌落 PCR 鉴定结果，挑取 A 图 10 个单克隆，PCR 产物大小均为 2200 bp，阳性率 100%。

八、常见问题与解决方法

常见问题	可能的原因	解决方法
平板上未长出克隆或克隆数目很少	引物设计不正确	引物包含 15 ~ 20 bp 同源序列（不计算酶切位点），GC 含量 40% ~ 60%。
	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。
	载体和插入片段不纯，抑制反应	1. 未纯化 DNA 使用体积不应超过 2 μ l（反应体系体积的 1/5）。2. 建议线性化载体、PCR 产物进行胶回收纯化。
	感受态细胞效率低	1. 感受态细胞的转化效率需大于 10^8 cfu/ μ g。2. 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。3. 选择克隆用感受态细胞（如 DH5 α /Fast-T1/XL10），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	PCR 产物混有非特异扩增产物	1. 优化 PCR 体系，提高特异性。2. 胶回收 PCR 产物。
	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。
	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 <i>Dpn</i> I 消化，或者对扩增产物进行胶回收纯化。