

EZ-Assembly One-Step Multi-fragment Cloning Kit

说明书

Cat. No.: EZ1102

一、产品简介

EZ-Assembly One-Step Multi-fragment Cloning Kit 是一款高效的一步法多片段无缝克隆试剂盒，可通过单个反应将一个或多个 DNA 片段同时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× Multi-fragment Fusion Mix，50℃ 反应 5 ~ 30 min 即可进行转化，完成定向克隆。

2× Multi-fragment Fusion Mix 含同源重组酶及高度优化的缓冲液体系，具有很高的多片段重组效率，可兼容 1 ~ 5 个片段的同源重组，同时保证了克隆成功率。

二、产品组分

货号（规格）	EZ1102-01 (5 Rxns)	EZ1102-02 (20 Rxns)	EZ1102-03 (40 Rxns)
组分			
2× Multi-fragment 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。

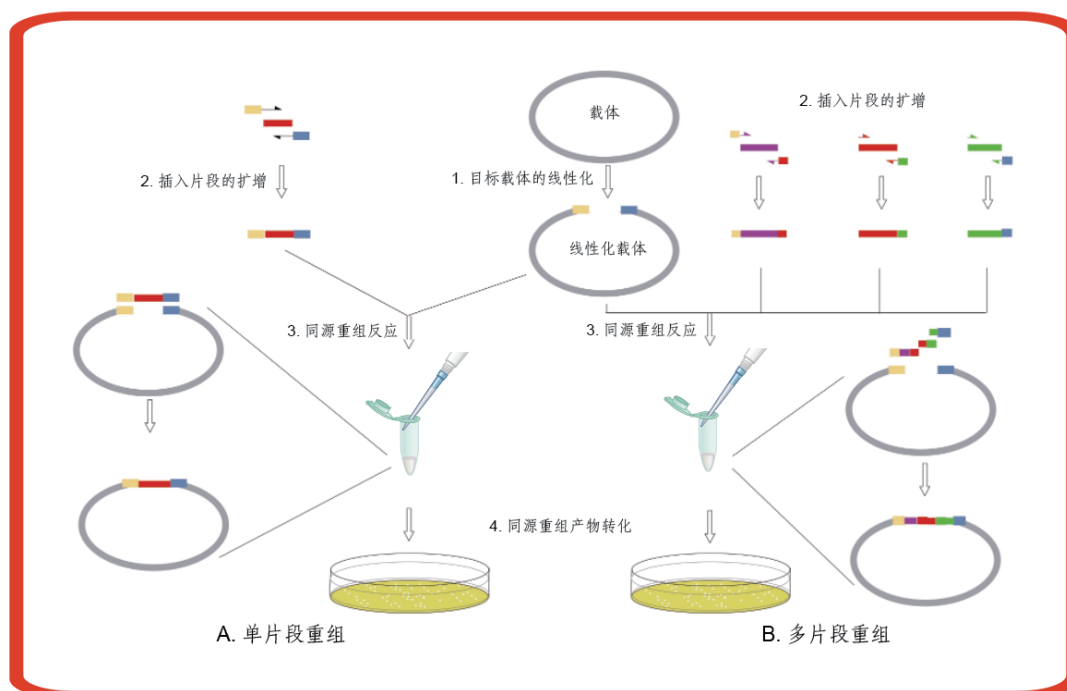
三、保存条件

本产品建议置于-20℃ 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、红色、绿色和蓝色标记），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。
3. 同源重组反应：将线性化载体和各插入片段按比例混合，50°C 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。
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。

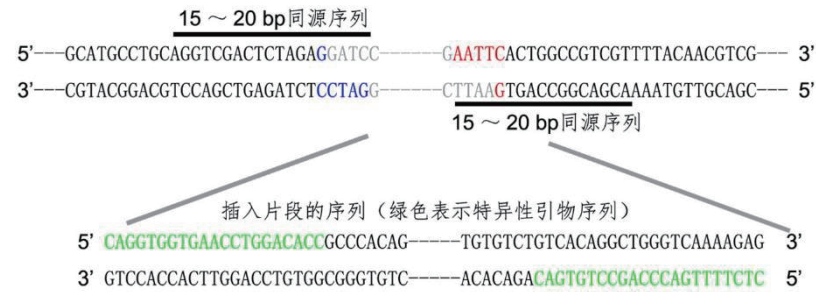
六、操作步骤

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。

注意：以环状质粒为 PCR 扩增模板时，建议扩增产物用 *Dpn* I 消化后再进行胶回收纯化，以减少残留环状质粒模板对克隆阳性率的影响。
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。
 - a. 单个插入片段的引物设计方法（示例 1）：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%，Tm 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）



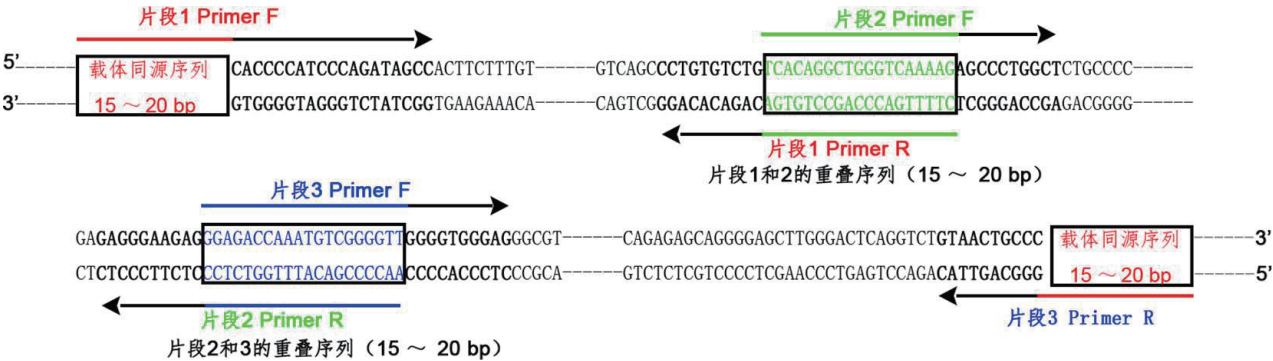
插入片段的扩增引物为：

Primer F: 5' AGGTCGACTCTAGAGGATCCAGGTGGTGAACCTGGACACC 3'

Primer R: 5' ACGACGGCCAGTGAATTCCTCTTTTGACCCAGCCTGTGAC 3'

示例 1：单片段插入的引物设计方法

b. 多个插入片段的引物设计方法（示例 2）：首片段和末尾片段引物的 5'端包含 15 ~ 20 个与载体末端完全同源的碱基序列，中间各片段的正向引物与前一个片段有 15 ~ 20 bp 的同源序列，反向引物与后一个片段有 15 ~ 20 bp 同源序列。引物长度超过 40 bp，建议选用 PAGE 纯化，可提高克隆成功率。



示例 2：多片段插入的引物设计方法

3. 同源重组反应：

① 使用前混匀 2× Multi-fragment Fusion Mix，于冰上配制同源重组反应体系：

组分	单片段重组反应	多片段重组反应	阴性对照
载体与每个插入片段的摩尔比	1:2	1:1	-
线性化载体 (μl)	X	X	X
n 个插入片段 (μl)	Y	Y1+Y2+.....Yn	0
2× Multi-fragment Fusion Mix (μl)	10	10	10
ddH ₂ O (μl)	补足到 20	补足到 20	补足到 20

载体用量和各插入片段可参考下列用量：

- a. 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。
- b. 插入多个片段的同源重组反应，载体与每个插入片段摩尔比为 1:1 时，重组效率最高。

c. 线性化载体的使用量应在 50 ~ 200 ng 之间；每个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 单片段重组反应，将反应体系置于 50°C 反应 5 min，反应结束后立即放在冰上。

2 ~ 3 片段重组反应，将反应体系置于 50°C 反应 15 min，反应结束后立即放在冰上。

4 ~ 5 片段重组反应，将反应体系置于 50°C 反应 30 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 μ l 感受态细胞悬液（如 DH5 α 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 μ l，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 μ l 上清。用剩余 100 μ l 培养基将菌体重悬。

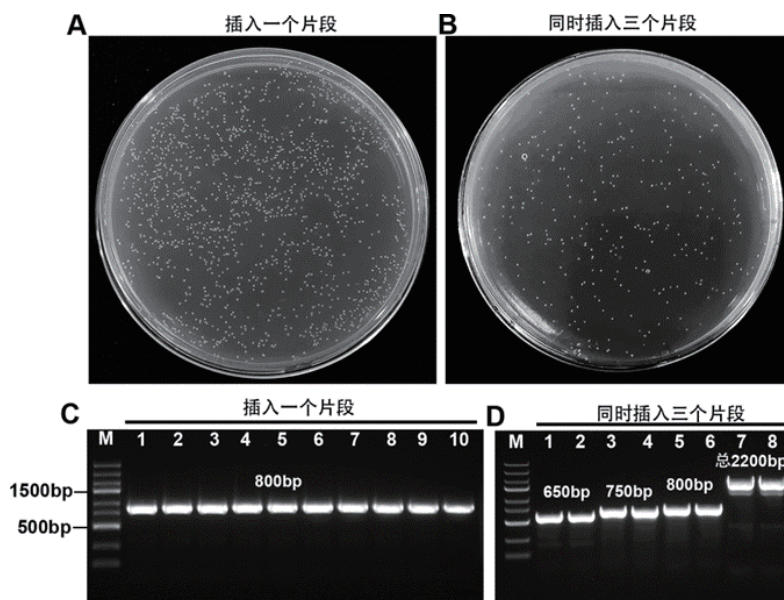
⑥ 涂布于含有相应抗性的固体培养基上，晾干。

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 分别进行插入一个片段和插入三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，本试剂盒可以高效兼容一至三个片段同源重组，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 800 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. 同时插入三个片段的重组产物转化平板。使用与单片段插入一样的线性化载体，三个插入片段长度分别为 650、750、800 bp，总计 2200 bp，线性化载体与每个插入片段的摩尔比为 1:1，50°C 反应 15 min。
- C. 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 800 bp，阳性率 100%。
- D. 插入三个片段的菌落 PCR 鉴定结果，挑取 B 图 2 个单克隆，单个片段的 PCR 产物大小分别为 650、750、800 bp，最终连接片段的大小为 2200 bp。

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。