

ClonExpress® II One Step Cloning Kit

C112



Vazyme Biotech Co., Ltd

Web: www.vazyme.com

Tel: 400-600-9335

Sales: sales@vazyme.com

Support: support@vazyme.com

Service: service@vazyme.com



ISO 9001: 2015



www.vazyme.com

Vazyme biotech co., ltd.

使用说明书

Version 9.1

目录 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/实验流程概要	03
07/实验步骤	03
07-1/线性化载体制备	03
07-2/插入片段获得	03
07-3/线性化载体与插入片段的使用量	05
07-4/重组反应	06
07-5/重组产物转化	06
07-6/重组产物鉴定	06
08/注意事项	08
09/常见问题与解决方案	09

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，可将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。将载体进行线性化，在插入片段正/反向PCR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，37°C反应30 min即可进行转化，完成定向克隆。

ClonExpress® II作为新一代重组克隆试剂盒，独特的非连接酶依赖体系，极大地降低了载体自连背景，阳性率可达95%以上。高度优化的反应缓冲液及增强的重组酶Exnase II，显著提高克隆的重组效率与对杂质的耐受度，使得线性化载体与插入片段不进行纯化直接用于重组克隆成为可能，极大的简化了实验步骤。

02/产品组分

组分	C112-01 (25 rxn)	C112-02 (50 rxn)
5 × CE II Buffer	100 µl	200 µl
Exnase II	50 µl	100 µl
500 bp control insert (20 ng/µl)	5 µl	5 µl
pUC19 control vector, linearized (50 ng/µl, Amp ^r)	5 µl	5 µl

03/保存条件

-30 ~ -15°C保存。-20 ~ 0°C运输。

▲使用过程中避免反复冻融。

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

片段扩增用模板、引物；线性化载体；

高保真聚合酶：Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme #P505)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；

DH5α Competent cell (Vazyme #C502)常规克隆，适用于 < 15 kb 质粒；

XL10 Competent cell (Vazyme #C503)大片段克隆，适用于 > 10 kb 质粒；

其他材料：ddH₂O、PCR管、PCR仪等。

06/实验流程概要

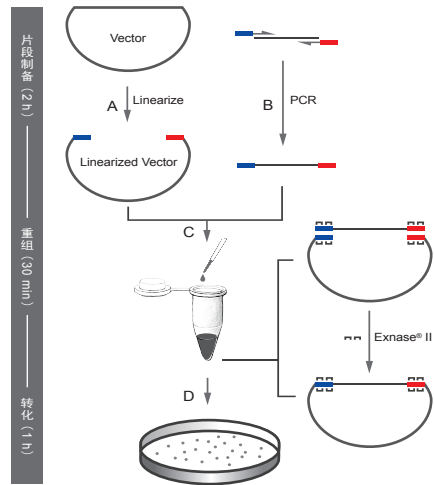


Fig 1. ClonExpress®快速克隆技术原理图

- 载体线性化：通过酶切或反向PCR获得线性化载体。
- 插入片段获得：将线性化载体末端15 - 20 bp序列作为同源序列(红色和蓝色标记)，并将其分别添加到基因特异性正/反向扩增引物序列的5'端，以此引物对扩增得到带有同源序列的插入片段。
- 重组反应：将线性化载体和插入片段按比例混合，在Exnase II催化下，37°C反应30 min即可完成重组反应，实现两线性化DNA的体外环化。
- 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。

07/实验步骤

07-1/线性化载体制备

- 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。

- 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使载体线性化完全，降低转化背景(假阳性克隆)；若使用单酶切线性化，请适当延长酶切时间以减少环状质粒残留，降低转化背景。

▲重组反应体系内无DNA连接酶，不会引发载体自连。因此，即使是单酶切方式制备的线性化载体也无需进行末端脱磷酸处理。重组产物转化后出现的假阳性克隆(无插入片段)，是由未线性化环状载体转化而形成。

◇反向PCR扩增制备线性化载体时，推荐使用高保真聚合酶Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme #P505)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。

07-2/插入片段获得

- 引物设计总原则：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，T_m值60 - 65°C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下载引物设计软件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：

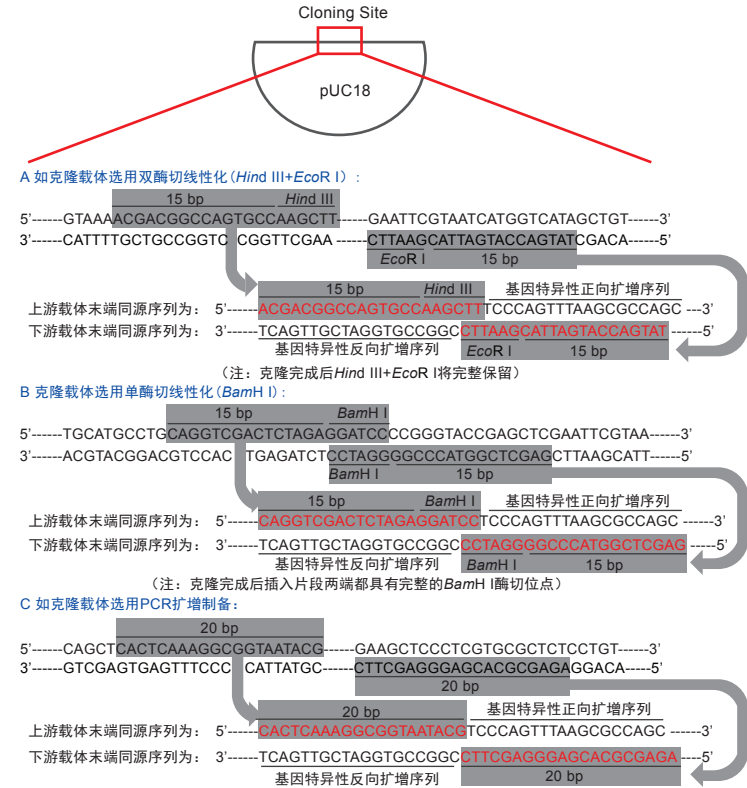


Fig 2. 插入片段扩增引物设计方案

▲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。计算扩增引物退火温度时，只需计算基因特异性扩增序列的T_m值，引入的同源序列及酶切位点不应参与计算。

2. 插入片段PCR扩增

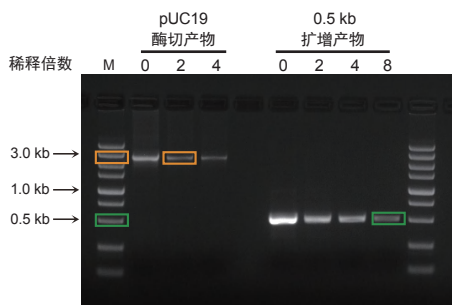
插入片段可用任意PCR酶(*Taq*酶或高保真酶)扩增，无需考虑产物末端有无A尾(重组过程中将被去除，在最终载体中不会出现)。但为了减少扩增突变的引入，推荐使用高保真聚合酶Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme #P505)进行扩增。

07-3/线性化载体与插入片段的使用量

1. 浓度测定:

ClonExpress®同源重组体系推荐使用电泳比较条带亮度的方法对DNA进行定量。

- ◇ 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，也可使用Onedrop等基于吸光值的仪器进行浓度测定，但只有当A260/A280在1.8-2.0之间时浓度值可信。当样品浓度低于10 ng时，不同型号的仪器基于A260得到的浓度值可能存在较大差异，推荐使用Qubit、PicoGreen等进行浓度测定。
- ◇ 若线性化载体或插入片段未经纯化，请务必按照下图所示，通过电泳比较条带亮度的方法对DNA进行定量。将线性化载体和插入片段分别做数个梯度稀释后，原液和稀释后产物各取1 μl上样进行电泳，与标准的DNA定量Marker（条带浓度均一旦确定）比较条带亮度以确定其近似浓度。



M: DL5000 Marker。上样5 μl，除1.0 kb条带为100 ng以外，其余条带DNA量均为50 ng。图中橙色框/绿色框分别标记线性化载体和插入片段在某个稀释梯度下与相近大小的Marker条带亮度相似。

因此：
Vector浓度约为：50 ng × 2 = 100 ng/μl。
Insert浓度约为：50 ng × 8 = 400 ng/μl。

Fig 3. 线性化载体和插入片段凝胶电泳浓度检测

2. 载体片段使用量计算:

ClonExpress® II重组反应体系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）。这些摩尔数对应的DNA质量可由以下公式粗略计算获得：

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)

例如，将长度为2 kb的插入片段克隆至长度为5 kb的克隆载体时，克隆载体的最适使用量应为：0.02 × 5000 = 100 ng；插入片段最适使用量应为：0.04 × 2000 = 80 ng。

- a. 当插入片段长度大于克隆载体时，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。
- b. 线性化克隆载体的使用量应在50 - 200 ng之间；插入片段扩增产物的使用量应在10 - 200 ng之间。当使用上述公式计算DNA最适使用量超出这个范围时，直接选择最低/最高使用量即可。
- c. 线性化克隆载体和插入片段扩增产物未进行DNA纯化直接使用时，加入总体积应不超过反应体系体积的1/5，即4 μl。

07-4/重组反应

1. 根据公式计算重组反应所需DNA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做适当稀释，各组分加样量不低于1 μl。

2. 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
插入片段 ^a	Y μl	0 μl	Y μl	1 μl
5 × CE II Buffer	4 μl	0 μl	0 μl	4 μl
Exnase II	2 μl	0 μl	0 μl	2 μl
ddH ₂ O	to 20 μl	to 20 μl	to 20 μl	to 20 μl

a. X / Y根据公式计算得到载体用量和插入片段用量。

b. 阴性对照-1可用来确认线性化克隆载体有无环状质粒残留，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。

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。

3. 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。

4. 37°C反应30 min；降至4°C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。重组效率在反应30 min左右达到最高，反应时间不足或者太长都会降低克隆效率。

▲ 重组产物可于-20°C存放一周，待需要时解冻转化即可。

07-5/重组产物转化

1. 在冰上解冻克隆感受态细胞(如：DH5α Competent cell, Vazyme #C502)。

2. 取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°C水浴热激45 sec后，立即置于冰上冷却2 - 3 min。

4. 加入900 μl SOC或LB培养基(不添加抗生素)，37°C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°C培养箱中预热。

6. 5,000 rpm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°C培养箱中倒置培养12 - 16 h。

07-6/重组产物鉴定

- ◇ 过夜培养后，重组反应转化平板上形成数百个单克隆，而阴性对照反应转化平板上的克隆数应显著少于前者。

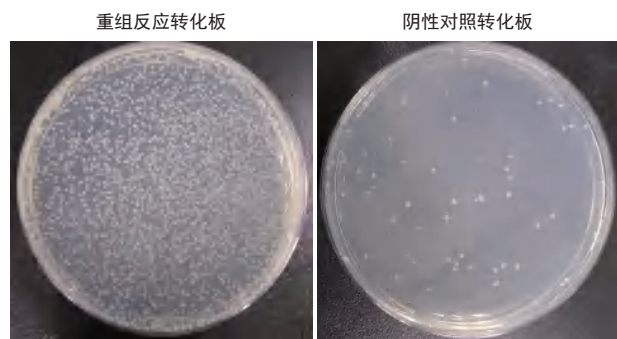


Fig 4. 过夜培养的平板

- ◇ 挑取重组反应转化平板上若干个克隆进行菌落PCR鉴定，扩增引物至少使用一条载体上的通用测序引物。如果克隆正确，应有长度略大于插入片段大小的条带出现(Fig 5)。

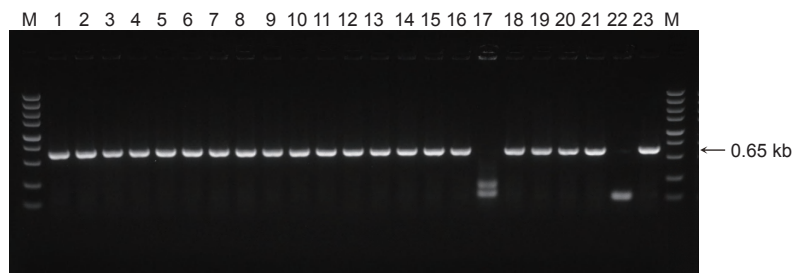


Fig 5. 菌落PCR琼脂糖凝胶电泳检测

M: DL5000 Marker; 1 - 23: 21个阳性克隆

- ◇ 菌落PCR鉴定为阳性的菌落，可再将剩余菌液接种至含有适当抗生素的液体LB培养基中培养过夜，提取质粒进行酶切鉴定(Fig 6)，或直接进行一代测序。

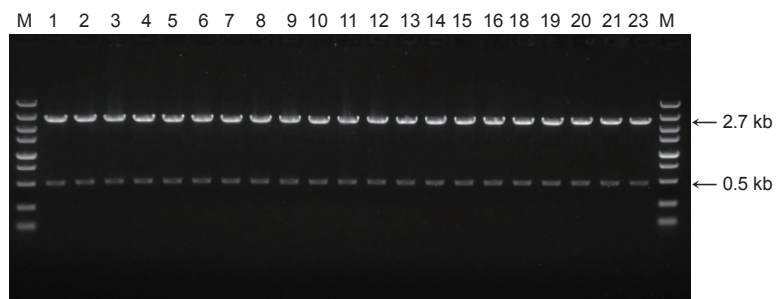


Fig 6. 酶切产物琼脂糖凝胶电泳检测

M: DL5000 Marker; 1 - 23: 21个阳性克隆

08/注意事项

1. 重组产物冰上冷却后，可直接转化感受态细胞，进行转化时，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。
2. ClonExpress®试剂盒可高效克隆50 bp - 10 kb片段。
3. 载体和插入片段的使用方式

◇当进行小片段(< 5 kb)克隆时:

- ▲ 酶切制备的线性化载体，可以通过加热失活内切酶(绝大多数内切酶适用，具体失活方式参见内切酶使用说明书)后直接用于重组反应。
- ▲ 反向PCR扩增制备的线性化载体，如扩增模板经预线性化处理且PCR产物电泳条带单一，扩增产物可以无需纯化直接用于重组反应。
- ▲ 对于插入片段，若琼脂糖凝胶电泳检测结果显示扩增产量足够且条带特异，同时扩增模板不是与克隆载体抗性相同的环状质粒，扩增产物可以无需纯化直接用于重组反应。不同情况下线性化载体与插入片段的使用方法可查阅Table 1/Table 2。

Table 1. 线性化载体的使用方法

线性化载体制备方式	模板类型	快速实验方案	最佳实验方案
酶切消化制备	环状质粒	加热失活内切酶后直接使用	胶回收
PCR制备	环状质粒	<i>Dpn</i> I消化后直接使用 (降解扩增模板)	胶回收或者 <i>Dpn</i> I消化后胶回收
	预线性化质粒、 基因组、cDNA	直接使用	胶回收
有明显非特异性扩增		胶回收	

Table 2. 扩增产物的使用方法

PCR扩增情况	PCR模板类型	快速实验方案	最佳实验方案
扩增特异	与克隆载体抗性 相同的环状质粒	<i>Dpn</i> I消化后直接使用 (降解扩增模板)	胶回收或者 <i>Dpn</i> I消化后胶回收
	预线性化质粒、 基因组、cDNA	直接使用	胶回收
有明显非特异性扩增		胶回收	

- ▲ 直接使用酶切产物或扩增产物进行重组反应时，使用体积不应超过4 μ l (重组反应总体积的1/5)。
- ▲ 插入片段扩增产物经*Dpn* I消化后，85°C加热20 min失活*Dpn* I活性，以避免重组反应时残留*Dpn* I对克隆载体的降解。

◇当进行大片段(> 5 kb)克隆时:

推荐使用高质量的胶回收试剂盒对线性化载体和片段扩增产物进行纯化，提高载体和插入片段的纯度。

09/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 载体的线性化方式有三种：双酶切、单酶切、反向PCR，优先选择双酶切。
- ③ 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%)+ 酶切位点(根据实验需求保留或者舍弃) + 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4 μ l(即反应体系体积的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pH 8.0的ddH₂O中。
- ④ 感受态细胞效率低：感受态细胞的转化效率需大于 10^7 cfu/ μ g。可进行简单检测，转化1 ng质粒，取1/10进行涂板，生长1000个菌斑，估算转化效率为 10^7 cfu/ μ g；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DH5 α /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。

- 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，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。