

# Easy Cloning 无缝克隆试剂盒操作说明



Version: HBRG-EC-002

## 产品信息

产品名称	Easy Cloning 无缝克隆试剂盒
货号	HB-EC-20T
存储及运输条件	-20℃保存，冰袋运输
规格	20T
有效期	2 年

## 产品简介

Easy Cloning 无缝克隆试剂盒是一种新型、快速并且高效的 Gibson Assembly DNA 定向克隆技术，可以在任意载体的任意位置一次插入多个目的基因片段。Easy Cloning 无缝克隆试剂盒操作极其简单，仅需在载体的克隆位点进行线性化，并在插入片段 PCR 引物的 5' 端引入与载体克隆位点两端完全一致的 15-25 bp 同源序列（图 1，图 3）。将上述线性化的克隆载体和带有同源序列的 PCR 片段按合适比例混合，并加入 Easy Cloning Master mix，通过反应体系中 DNA 外切酶、DNA 聚合酶以及连接酶的在 50℃反应 20 min 即可快速完成定向克隆，阳性率几近 100%。

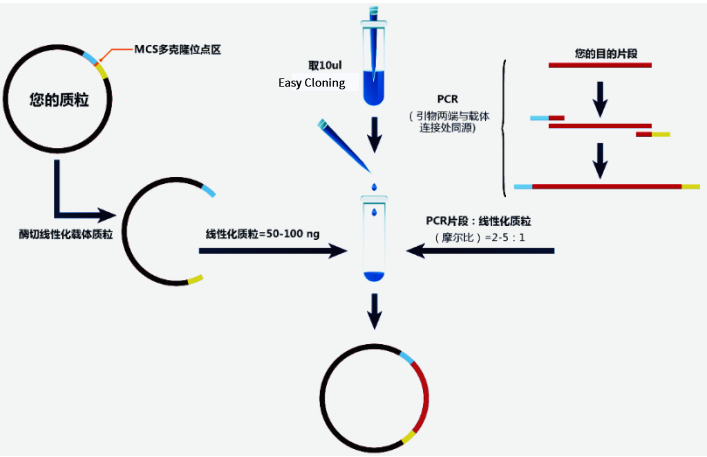


图 1. Easy Cloning 快速克隆试剂盒原理示意图。1. 线性化目的载体（左上）；2. PCR 获取

目的片段。设计的引物 5' 需要和线性化载体末端有 15-25 bp 的重叠（图中蓝色和黄色片段，细节可参考图 3）；3. 按照一定比例把二者混合在 Easy Cloning 的 2X 预混液内，50°C 反应 20 min 后直接转化 E.coli 即可。

## 产品优势

1. 相比于传统的同源重组的无缝克隆方法进行，Easy Cloning 试剂盒更高效，操作更简单，只需要一次反应即可完成定向克隆；
2. 对酶切位点无要求，可以把目的片段插入到任意载体的任意位点；
3. 连接片段之间不会引入任何其他序列；
4. 可以同时克隆多个片段。

## 产品包装

产品组成	使用次数	体积
2 x Easy Cloning Master mix	20tests	200uL
Positive linearized pUC vector (250 ng)	5tests	25uL
Positive control insert (500 ng)	5tests	25uL
储存条件	-20°C	

## 使用说明

汉恒生物建议 2-3 个片段连接时，DNA 片段的使用总量为 0.02-0.5 pmols，4-6 片段连接时加入的 DNA 总量为 0.2-1.0 pmols。其中线性化载体通常用 50-100 ng，插入片段：线性化载体的摩尔比一般控制在=2：1-3：1（如果插入片段<200 bp，建议插入片段：线性化载体的摩尔比控制在 5：1 以上）。DNA 拼接效率随着拼接片段的数量增加或者拼接片段长度的增加逐渐降低。

通用计算公式 A（单片段，insert/载体=3：1）：

线性化载体 (x bp)	$x/50\text{ng}$	~0.03 pmols
插入片段 1 (y bp)	$3y/50\text{ng}$	~0.09 pmols

通用计算公式 B (2 片段, insert/载体=3: 1, 片段摩尔比 1: 1)

线性化载体 (x bp)	x/50ng	~0.03 pmols
插入片段 1 (y1 bp)	3y1/100ng	~0.045 pmols
插入片段 2 (y2 bp)	3y2/100ng	~0.045 pmols

通用计算公式 C (3 片段, insert/载体=3: 1, 片段摩尔比 1:1:1, DNA 总量增加为单片段的 2 倍)

线性化载体 (x bp)	x/25ng	~0.06 pmols
插入片段 1 (y1 bp)	y1/25ng	~0.06 pmols
插入片段 2 (y2 bp)	y2/25ng	~0.06 pmols
插入片段 3 (y3 bp)	Y3/25ng	~0.06 pmols

通用计算公式 D (N=4-6, 为插入片段数, insert/载体=3: 1, 片段摩尔等比, DNA 总量增加为单片段的 10 倍)

线性化载体 (x bp)	x/5ng	0.3 pmols
插入片段 1 (y1 bp)	3y/5N ng	~0.9/N pmols
插入片段 2 (y2 bp)	3y/5N ng	~0.9/N pmols
插入片段 3 (y3 bp)	3y/5N ng	~0.9/N pmols
.....	.....	.....

附: 片段摩尔数量计算公式:

pmols=片段质量(ng)x1000/(碱基对数 x650 daltons) (碱基数越多, pmols 越少; 质量越大, pmols 越多), 举例如下:

线性化载体 (~5000 bp)	100ng	~0.03 pmols
插入片段 (~500 bp)	20-30ng	~0.06-0.09 pmols

## 操作步骤

### 1. 制备线性化载体和插入片段

#### 1.1. 载体制备---线性化处理

##### A.质粒酶切法

在目标载体质粒上选取合适的位点进行单酶切或双酶切，对酶切后的载体进行割胶纯化。

注：1. 为了降低载体自连背景，提高阳性率，建议采用双酶切载体质粒。酶切最好能切出一个较大片段，这样回收的目的条带可以和没有切开的质粒明显分开。

2. 质粒单酶切容易造成载体切割不完全和自连，导致假阳性的产生。因此，必须单酶切的时候建议延长酶切时间并脱磷处理（酶切 2hr 过夜，CIP 处理 20 min），同时做好空载的对照。

3. 请务必跑胶回收线性化的载体，否则非线性化质粒会带来极高的背景。

4. 一种特殊情况：如果采用双酶切彻底线性化载体，而插入片段又没有双酶切的识别位点，也可以跳过纯化步骤，只需热失活内切酶即可用于下一步拼接反应。

##### B.质粒 PCR 法

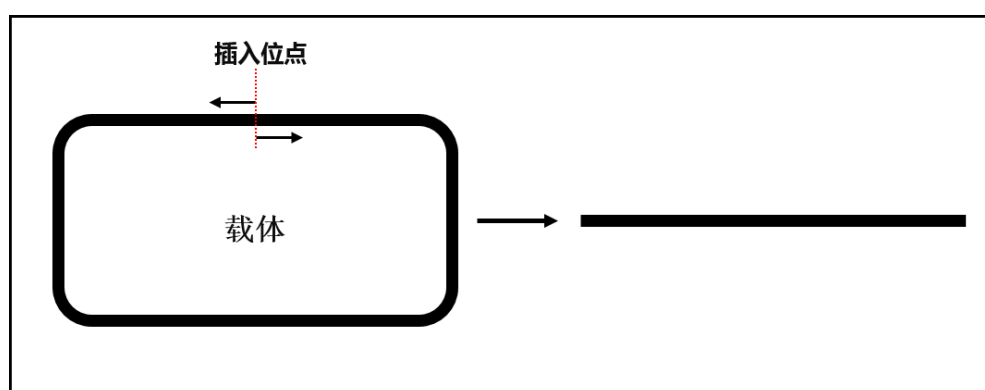


图 2. PCR 法线性化载体示意图。在插入位点两侧设计一对方向相反的引物对载体进行扩增，通过跑胶回收获取线性化载体片段。

选取合适的位点，设计正向和反向引物直接进行载体质粒的 PCR 扩增，一般载体长度均大于 3 kb，建议采用高保真的 DNA 聚合酶扩增。为了避免模板质粒 DNA 对后续试验的影响，建议对 PCR 扩增后的线性化载体进行割胶纯化，去除环状模板质粒，提高阳性率。

注：为了降低模板带来的背景，我们可以在 PCR 之后直接加入 0.5 uL 的 DpnI 消化甲基化模板（一般常用感受态都是来源于 dam/dcm 非缺陷的 E.col，可以甲基化质粒，如 DH5α 来源的质粒等），37°C 消化 0.5-1hr，然后再跑胶回收线性化片段。

#### 1.2. 目的插入片段制备

设计引物进行目的片段 PCR 扩增，引物设计要保证目的片段两端有 15~25 bp 序列与线性化载体的两端一致（重叠序列的  $T \geq 48^\circ\text{C}$ ，可以简单假设 A-T 碱基对=2°C，G-C 碱基对=4°C）便于拼接反应的进行。PCR 引物包括 5' 端与载体同源的 15-25 bp 以及目的片段特异性序

列 20-25bp（见下图 3）（建议使用 Snapgene 软件自动设计引物，详见教程）。PCR 产物经跑胶纯化待用。

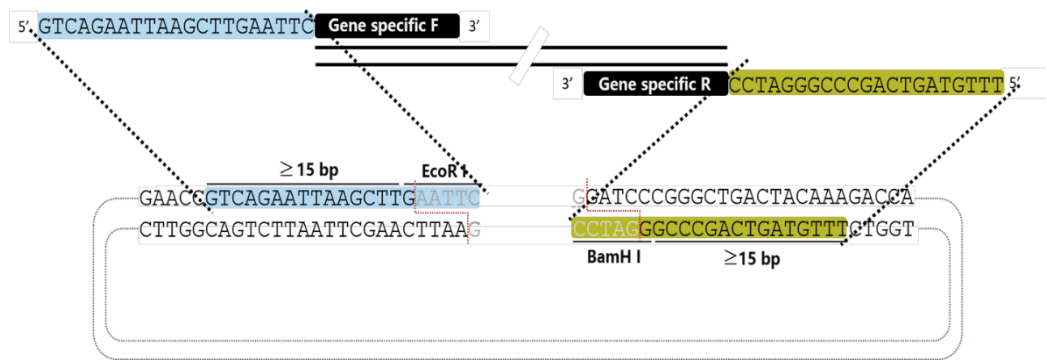


图 3. 采用 Easy Cloning 试剂盒时 PCR 上下游引物设计示例。针对双酶切法线性化载体设计插入片段的 PCR 引物，其重叠区域为 15-25bp+酶切位点，这样重组成功的质粒上会完好保留此两个酶切位点。如果是 PCR 法线性化载体，扩增插入片段的 PCR 引物 5' 端直接设计成与线性化载体末端 15-25 bp 重叠即可。

## 2. 冰上融化并且充分混匀 Easy Cloning Master mix，配制反应体系

	2-3 片段	4-6 片段	阳性对照
PCR 产物 + 线性化载体质粒	XuL (0.02-0.5pmols)	XuL (0.2-1pmols)	
Easy Cloning Master Mix (2X)	10uL	10uL	10uL
超纯 H <sub>2</sub> O	Up to 20uL	Up to 20uL	-

3. 上述反应体系置于 50℃孵育 20 min（2-3 个片段拼接）/60 min（4-6 个片段拼接）。反应完成之后如不能马上进行后续操作可将反应样品暂储存于-20℃。

## 4. 转化感受态菌

- 4.1. 在冰上融化一支 50 uL 的 DH5α 感受态菌(配合汉恒生物专门为该试剂盒研制的感受态细胞，效果更佳)。
- 4.2. 取 2 uL 第 3 步中的反应样品加入融化好的感受态菌中，轻轻混匀，不能震荡混匀。将该混合物置于冰上 30min。
- 4.3. 轻轻摇匀后放入 42℃水浴中 1-2 min 进行热激，然后迅速放回冰中，静置 3-5min。
- 4.4. 在超净工作台中向上述各管中分别加入 500 uL LB 培养基（不含抗菌素）轻轻混匀，然

后固定到摇床的弹簧架上

37°C震荡 1hr，摇床转速 250 rpm。

4.5. 在超净工作台中取上述转化混合液 100-300 uL，分别滴到含合适抗菌素的固体 LB 平板培养皿中，用酒精灯烧过的玻璃涂布棒涂布均匀（注意：玻璃涂布棒上的酒精熄灭后稍等片刻，待其冷却后再涂）。

37°C培养箱中培养过夜。

4.6. 挑取平板上的克隆进行菌落 PCR 或者酶切鉴定（菌落 PCR 鉴定容易出现假阳性，请务必带上阴性对照）。