杭 州 新 景 生 物 试 剂 开 发 有 限 公 司
地址：浙江省杭州市西湖科技经济园西园一路 8 号 4 幢 5F
邮编：310030 电话：0571-87381295 传真：0571-87381297

One Step DNA Cloning Kit 说明书

产品组成

One Step DNA Cloning Kit Cat. No.	50 次
One Step DNA Cloning Mix pUC19 Control Plasmid,Linearized (Amp^+, 40 ng/μl) 500 bp Control Insert (20 ng/μl) 说明书	250 μl 5 μl 5 μl 1 份

产品储存与有效期

－20℃保存，有效期为 2 年。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品是基于重组原理的无缝克隆技术，能简单、快速、高效地实现 DNA 的定向克隆。不依赖繁琐的酶切、连接步骤，也不需要末端补平等操作，通过 DNA 片段与线性化载体末端的 15~25 nt 同源序列的重组，可将插入片段重组至任意线性载体的任意位点。

本产品可一次完成多个 DNA 片段的重组，单片段重组最快仅需 5 分钟，且阳性率高于 95%。经过优化的反应体系，能有效提高克隆阳性率，并能够在一定程度上耐受未纯化的 PCR 产物中的杂质，具有更高的阳性率、更强的兼容性。

实验步骤

1. 线性化载体的制备

选择合适的克隆位点，对载体进行线性化，载体的线性化方法有酶切或反向 PCR 扩增。

①酶切制备

推荐使用快速内切酶（单酶切或双酶切）使载体线性化，从而降低转化背景，减少未酶切的载体转化造成的假阳性克隆。使用普通内切酶单酶切时，可适当延长酶切时间，以减少环状质粒的残留。

注 1：单酶切的线性化载体需要去磷酸化，双酶切则无需去磷酸化。

注 2：酶切完成后，建议将内切酶失活或对目的产物纯化后用于重组反应。

②反向 PCR 扩增

推荐使用高保真 PCR Mix 进行扩增，以减少扩增突变的概率。推荐使用线性化后的质粒作为模板，以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。

注 1：以环状质粒为模板时，PCR 产物需使用 MinuteCut™ Dpn I（Cat. No.: 6020050）消化后再纯化回收，以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。

注 2：多片段克隆时，建议将 PCR 产物纯化后使用。

2. 插入片段制备

①引物设计原则

插入片段的引物包括 15-25nt 的重叠区域和特异性引物两部分，即在插入片段的正/反引物的 5’端引入与相邻片段（插入片段或线性化载体）末端同源的 15-25nt（推荐 18nt），使得扩增后的插入片段末端带有相邻片段末端一致的同源序列。

F 正向引物（5’-3’）：上游载体末端同源序列+酶切位点（可选）+基因基因特异性正向扩增序列

R 反向引物（5’-3’）：下游游载体末端同源序列+酶切位点（可选）+基因基因特异性反向扩增序列

注 1：假如载体为粘性末端，且 3' 端突出，则引物设计必须包含突出部分；若 5' 端突出，则引物设计可

以包含突出部分，也可以不包含。

注 2：尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域进行克隆，当载体克隆位点上下游 25 nt 区域内 GC 含量为 40%~60% 时，重组效率最高。

注 3：计算扩增引物 Tm 值时，只需要计算特异性引物的 Tm 值，引入的额外序列无需计算。

②插入片段的 PCR 扩增

推荐使用高保真 PCR Mix 进行扩增，以减少扩增突变的引入。建议使用纯化后的 PCR 产物进行无缝克隆反应，若 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定为特异性扩增产物，可直接使用，但加样体积不应超过总反应体积的 20%。

3. 重组反应

① 于冰水浴中配置以下反应体系：

组分	反应体系	阴性对照	阳性对照（可选）
One Step DNA Cloning Mix	5 μl	5 μl	5 μl
线性化载体	50~200 ng	50~100 ng	1 μl（pUC19 Control Plasmid,Linearized）
插入片段	10~200 ng	-	1 μl（500 bp Control Insert）
ddH_2O	To 10 μl		

a. 最适载体用量 (ng) = 0.02 × 载体碱基对数，即 0.03 pmol。

b. 插入单片段，最适片段用量（ng）= 0.04 × 片段碱基对数；

插入多片段，每片段最适用量（ng）= 0.02 × 片段碱基对数。

注 1：若插入单片段的长度大于载体，则应互换载体与插入片段用量；

注 2：若插入片段的长度小于 200 bp，则插入片段应使用 5 倍载体用量；

注 3：若按上述公式计算得到的用量超过最低 / 最高值，则建议直接按最低 / 最高用量使用；

注 4：载体片段过长、插入片段过长或片段数过多，克隆阳性率均会降低。重组反应体系配制完成后，用移液枪轻轻吸打混匀各组分，避免产生气泡，切勿涡旋；

注 5：各组分用量最好不低于 1μl，可将组分稀释后再加入。

② 将反应体系置于 50℃反应，反应时间如下

插入片段数目	反应时间
1~2 个插入片段	5~15 min
3~5 个插入片段	15~30 min

注 1：当载体片段>10 kb 或插入片段>4 kb 时，建议延长反应时间到 30~60 min；

注 2：推荐使用 PCR 仪等温控比较精准的仪器进行反应，反应时间不足或太长克隆效率均会降低；

注 3：50℃反应完成后，建议进行瞬时离心，将反应液收集至管底。

③ 将重组产物置于冰上冷却，之后进行转化或者储存于－20℃备用。

注 1：－20℃储存的重组产物，建议在 1 周内使用。

4. 重组产物转化

①. 取 5~10 μl 反应液，加入到 100 μl 感受态细胞中，缓慢吸打混匀，冰上放置 30 min。

②. 42℃热激 45~60 sec，冰浴 5 min。

③. 加 500 μl SOC 或 LB 培养基，37℃ 振荡培养 40~60 min（200 rpm）。

④. 将菌液均匀涂布在含有对应抗生素的平板上，倒置于 37℃过夜培养。

5. 阳性克隆测试

①. 菌落 PCR 法：挑单克隆至 10 μl ddH_2O 混匀作为模板；使用合适的正、反向引物进行菌落 PCR 鉴定。

注 1：扩增引物至少使用一条载体上的引物。

②. 酶切法：挑取单菌落至合适抗性的液体培养基中过夜培养后，提取质粒进行酶切鉴定。

③. 测序鉴定：使用载体上合适引物测序，进行测序分析。