

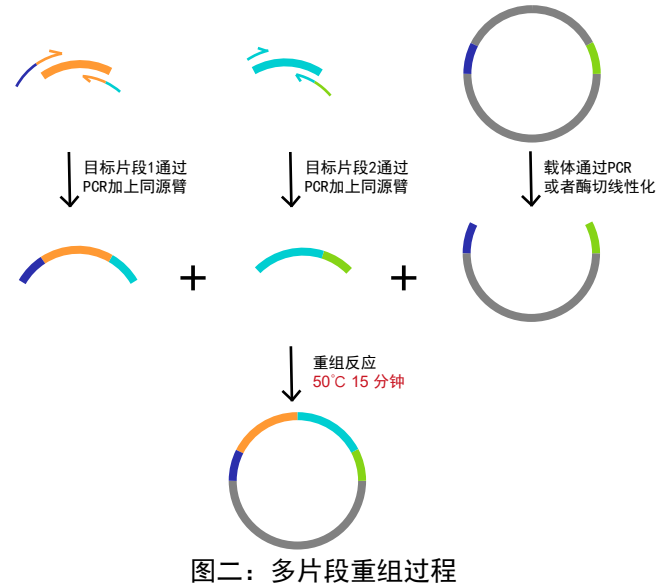
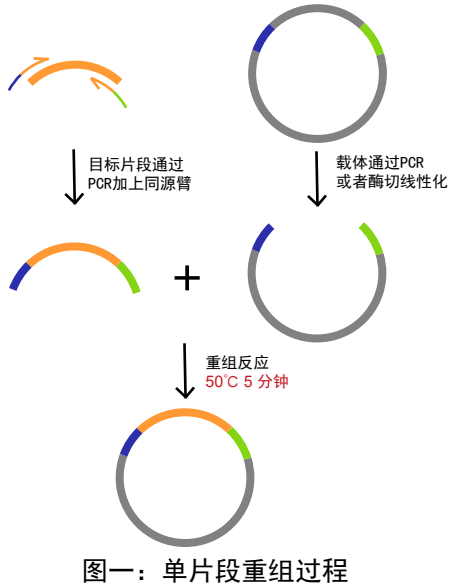
One-Tube Cloning Kit

货号: B101

保存条件: -20 °C

产品介绍:

本品含有的5 × One-Tube Cloning Mix可将单个或者多个片段基于同源重组原理克隆至目标载体, 克服了传统酶切连接需要特定酶切位点的缺点, 具有DNA使用量少、兼容长短片段、方便简单的特点。重组后的产物可以直接用于转化。反应只需要在恒温仪器里面进行 (50°C重组反应5-15min), 相比传统酶切连接耗时长的缺点, 本品有明显的优势。单片段及多片段重组过程如下:



产品组成:

组分	B101-01 (20个反应)
5 × One-Tube Cloning Mix	40 μL
Control Vector	5 μL
Control Template	5 μL

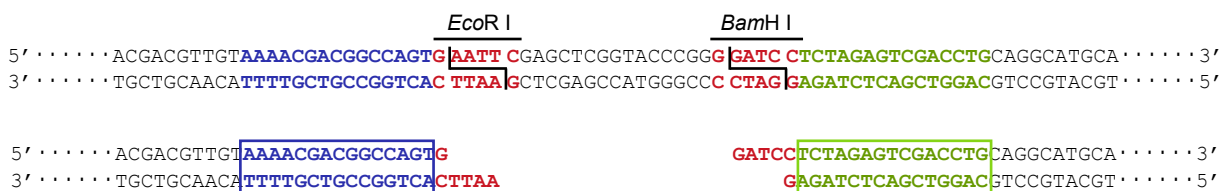
产品特点:

- 任意 · 无需找酶切位点, 不引入额外序列;
- 简单 · 预混液, 一管Mix解决克隆问题;
- 快速 · 重组只需要5-15分钟;

产品使用:

A. 制备线性化目标载体

目标载体可以通过酶切方式线性化 (推荐使用双酶切, 酶切彻底以减少假阳性克隆); 或者通过PCR方式线性化 (即把需要的骨架部分PCR出来, 注意环状质粒作为PCR模板加入0.1 -1.0 ng, 以减少假阳性克隆)。PCR扩增推荐使用EnzyArtisan # T202 或者EnzyArtisan # G302)。推荐使用胶回收线性化的目标载体。如下以EcoRI、BamHI双酶切pUC19为例:



## B. 获得目标片段

目标片段扩增引物5'端分别引入与线性化载体两端一致的15-25 bp同源臂序列（酶切位点不计入同源臂长度）。

PCR扩增推荐使用EnzyArtisan # T202 或者EnzyArtisan # G302，PCR产物纯化后用于下一步实验。

### B.1 获得单片段目标片段引物设计（以GAPDH克隆到pUC19载体为例）

GAPDH用含同源臂的引物扩增（红色的酶切位点序列可以去除，按实际需要处理）：

```
5' -AAAACGACGGCCAGT (GAATTC) ATGGTTTACATGTTCCAATATGATTCC
5' -ATGGTTTACATGTTCCAATATGATTCCACC ·····CTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAA-3'
3' -TACCAAATGTACAAGGTTATACTAAGGTGG ·····GAGTACCGGGGTACCGGAGGTTCCCTCATT-5'
GGTGTACCGGAGGTTCCCTCATT (CCTAGG) AGATCTCAGCTGGAC-5'

5' -AAAACGACGGCCAGT (GAATTC) ATGGTTTACATGTTCCAATATGATTCCACC ·····CTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAA (GGATCC) TCTAGAGTCGACCTG-3'
3' -TTTGTCTGCCGGTCA (CTTAAG) TACCAAATGTACAAGGTTATACTAAGGTGG ·····GAGTACCGGGGTACCGGAGGTTCCCTCATT (CCTAGG) AGATCTCAGCTGGAC-5'
```

### B.2 获得多片段目标片段引物设计（以GAPDH与GFP融合克隆到pUC19载体为例）

B.2.1 GAPDH用含同源臂的引物扩增（红色的酶切位点序列可以去除，按实际需要处理）：

```
5' -AAAACGACGGCCAGT (GAATTC) ATGGTTTACATGTTCCAATATGATTCC
5' -ATGGTTTACATGTTCCAATATGATTCCACC ·····CTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAA-3'
3' -TACCAAATGTACAAGGTTATACTAAGGTGG ·····GAGTACCGGGGTACCGGAGGTTCCCTCATT-5'
GGTGTACCGGAGGTTCCCTCATTTCCTCTTCTT-5'

5' -AAAACGACGGCCAGT (GAATTC) ATGGTTTACATGTTCCAATATGATTCCACC ·····CTCATGGCCCACATGGCCTCCAAGGAGTAA (GGATCC) TCTAGAGTCGACCTG-3'
3' -TTTGTCTGCCGGTCA (CTTAAG) TACCAAATGTACAAGGTTATACTAAGGTGG ·····GAGTACCGGGGTACCGGAGGTTCCCTCATT (CCTAGG) AGATCTCAGCTGGAC-5'
```

B.2.2 GFP用含同源臂的引物扩增（红色的酶切位点序列可以去除，按实际需要处理）：

```
5' -AGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGG
5' -AGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTT ·····TACAAACACCATCACCATCACCATCACTAG-3'
3' -TCATTTCTCTTCTTGAAAAGTGACCTCAA ·····ATGTTTGTGGTAGTGGTAGTGGTAGTGATC-5'
TTGTGGTAGTGGTAGTGGTAGTGATC (CCTAGG) AGATCTCAGCTGGAC-5'

5' -AGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTT ·····TACAAACACCATCACCATCACCATCACTAG (GGATCC) TCTAGAGTCGACCTG-3'
3' -TCATTTCTCTTCTTGAAAAGTGACCTCAA ·····ATGTTTGTGGTAGTGGTAGTGGTAGTGATC (CCTAGG) AGATCTCAGCTGGAC-5'
```

## C. 重组反应体系

组分	实验体系	阳性对照体系
线性化载体	0.03 pmol*	1 μL
插入片段	0.06 pmol* (多片段，每个0.03 pmol)	1 μL
5 × One-Tube Cloning Mix	2 μL	2 μL
DNase free H <sub>2</sub> O	补足至10 μL	6 μL

\*ng和pmol转换公式：ng = 0.66 × 片段长度 × pmol (以上体系0.03 pmol即加入 [0.02 × 长度] ng；以上体系0.06 pmol就是加入 [0.04 × 长度] ng)

## D. 重组反应条件

单片段重组反应，50℃反应5分钟，之后放入4度或者冰浴中；

多片段重组反应，50℃反应15分钟，之后放入4度或者冰浴中。

## E. 重组反应产物转化

（使用化学感受态可参照以下步骤，或以使用的感受态说明书为准）

E.1 在冰上解冻克隆感受态细胞，取10 μl重组产物加入到100 μl感受态细胞中，轻弹管壁混匀，冰上静置30 min。

E.2 42℃水浴热激45秒，立即冰上冷却2-3分钟。加900 μl SOC或LB培养基(不添加抗生素)，37℃摇菌1小时(转速200 - 250 rpm)。

E.3 将相应抗性的LB平板固体培养基在37℃培养箱中预热。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。

E.4 37℃培养箱中倒置培养12-16 h。

## F. 克隆鉴定

PCR鉴定/酶切鉴定/测序