



2 × Clone Mix 使用说明书（精简版）

One Step Cloning Kit V3.1

Components	KpA101-1	KpA101-5
2 × Clone Mix	250 µl × 1	250 µl × 5

1. 产品概述

一步法无缝克隆（同源重组）是一种简单、高效的快速克隆技术，无需对 DNA 片段进行酶切，可将 DNA 片段直接定向连接至线性化载体。2 × Clone Mix（One Step Cloning Kit V3.1）基于同源重组技术，创新的反应体系，克隆效率更高，兼容性更加广泛。

2. 保存条件

-20 °C 保存，有效期 2 年；冰袋运输。

3. 产品用途

快速克隆；高通量克隆；无缝克隆；DNA 定点突变。

4. 实验方法（单片段、双片段重组）

（1）双酶切或单酶切，得到线性化载体。

（2）设计引物，同源臂长度 15~30 bp，同源臂互补区域 Tm 大于 50°C，以确保在 50°C 反应时顺利退火。根据自己的实验需求设计引物，保留酶切位点或完全删除多余氨基酸（详见实验原理），并确保 N 端不移码。DNA 片段小于 5 kb，同源臂 20~25 bp 效率高。DNA 片段大于 5 kb，同源臂 25~30 bp 效率高。

（3）同源重组反应体系（10 µl）

X µl	片段
Y µl	线性化载体
5 µl	2 × Clone Mix

$X+Y=5$ ，反应体系总体积为 10 µl。

最佳反应体系，线性化载体：片段 = 1 : 1 ~ 1 : 5（摩尔比），10~100 ng DNA。2 × Clone Mix 酶浓度高，兼容性强，1 片段、2 片段重组无需严格计算，等体积加入即可，载体浓度低可多加一些。本产品兼容高浓度 DNA，反应体系无需加水。推荐使用 PCR 管进行反应，先加入 DNA，再加入 2 × Clone Mix，用移液器吸打混匀，避免气泡，再瞬时离心。

(4) 50℃水浴反应 15~30 min (30 min 效率最高), 但不超过 60 min。也可使用 PCR 仪进行反应, 50℃ (热盖 60℃) 反应 30 min。如果同源臂比较短, 15 bp 左右, T_m 值较低, 50℃难退火, 可以先使用 37℃反应 10 min, 再使用 50℃反应 10~20 min。重组反应完成后, 冰浴 2 min, 此时重组产物可用于转化。

5. 实验方法 (多片段重组)

(1) 多片段重组, 基因首尾引物设计原则与单片段重组相同。片段之间设计同源臂 20 bp 左右, T_m 大于 50℃即可, 提高同源臂长度 (特异性提高) 可以提高重组准确率。尽量避免使用小于 50 bp 小片段, 高活性的 T5 核酸外切酶 (5'~3'外切酶活性) 从 DNA 的两个 5'端同时切割, 有被切碎的风险。建议使用重叠 PCR 将短片段组装到相邻片段上。如若必须使用短片段重组, 建议提高短片段加入比例 (提高 5~10 倍), 用以降低被完全切割的风险。

(2) 多片段重组反应体系

因为线性化载体摩尔浓度远低于片段, 所以只需要计算各片段的加入比例。以 5 片段重组为例, 配制多片段等摩尔比混合池。将 5 个片段按照计算体积 (计算方法见详细版说明书), 混合为 10 μl 多片段等摩尔比混合池, 各片段摩尔比为 1:1:1:1:1。

同源重组反应体系 (10 μl):

3 μl 多片段等摩尔比混合池

2 μl 线性化载体

5 μl 2 × Clone Mix

反应体系总体积为 10 μl, 50℃重组反应 30 min。

6. 实验方法 (重组产物转化)

(1) 将 5 μl 重组产物加入 100 μl 化学转化 (热激) 感受态细胞 DH5α, 轻弹管壁混合均匀, 冰上静置 30 min。重组产物的加入体积不应超过化学转化感受态细胞体积的 1/10。如果使用电激转化感受态细胞, 重组产物的加入体积应该进一步降低。

(2) 42℃水浴热激 60s, 然后立即冰浴 2 min。

(3) 加入 900 μl SOC 或 LB 液体培养基 (不含抗生素), 37℃摇床 200 rpm 摇菌孵育 1 h。

(4) 取 100 μl 菌液均匀涂在抗性的平板上。如果是多片段重组或感受态细胞活性低, 可以离心收集菌体, 全部涂在平板上。

(5) 37℃培养箱中倒置培养 12~16 h。

(6) 菌落 PCR 鉴定阳性菌落。

(7) 每个克隆挑选 1~2 个阳性菌落测序鉴定。

注: 本产品仅供科学研究使用, 不用于临床诊断。

武汉科尔普生物科技有限公司

电话 13871574944