

Ezmax[®] Universal CloneMix

产品简介

2 ×Ezmax[®] Universal CloneMix是基于同源重组原理开发的一步法单片段 /多片段通用型无缝克隆试剂盒，Ezmax[®]系列重组克隆试剂盒属于非连接酶依赖型体系，载体自连背景极低。高度优化的 2 ×Ezmax[®] Universal CloneMix预混了增强型重组酶和重组反应所需缓冲液，可显著提高克隆的重组效率及对杂质的耐受程度，因此制备的高纯度线性化载体和插入片段可不纯化直接用于重组克隆，大大简化了实验操作。

本试剂盒可以将含有载体末端重叠区域的插入片段定向重组至任何载体的任何位点，不受酶切位点限制（特殊情况，如有毒基因的克隆或插入外源 DNA后导致质粒本身不稳定等除外），可以插入单个片段，也可以一次插入多至 6个顺序拼接的片段，载体末端与插入片段末端以及相邻插入片段末端之间需要 15~25 bp能够相互同源重组的完全一致的序列。插入片段和线性化载体在重组酶作用下，仅需 37℃反应 5~30 min即可完成重组，重组产物不依赖连接酶直接转化至感受态细胞，所获得的阳性克隆率在 95%以上。

产品组分

组分	24305 -01 (50 rxns)	24305 -02 (100 rxns)
2 ×Ezmax [®] Universal CloneMix	125 μL ×2	125 μL ×4
Control (Vector + Inserts, Ar ^r) ^a	25 μL	25 μL

a.阳性对照 Contro^l中包含了 4.6 kb的线性化载体和 1 kb的插入片段，Amp^r抗性。使用时直接取 5 μL Contro^l加入 5 μL 2×Ezmax[®] Universal CloneMix 即组成 10 μL反应体系。

保存条件

-20℃ 储存，≤0℃ 运输。

产品特点

- ◇可在 5~30 min内完成重组；
- ◇不受酶切位点限制，无需对片段酶切；
- ◇不引入额外序列。

适用范围

适用于 1~6个片段的快速无缝克隆实验。

Ezmax[®] Universal CloneMix

单片段同源重组

多片段同源重组

实验流程

操作示例

1. 制备线性化载体

在目标载体上选择合适的克隆位点，对克隆载体进行线性化处理。建议尽量选择无重复序列、无高级结构且 GC 含量在 40%~65% 之间的区域。常用载体线性化方法有以下 2 种：

1.1 酶切法制备线性化载体

针对较大的载体且有合适的酶切位点时，建议使用酶切法。其中，双酶切比单酶切的效果更好。双酶切方法使载体线性化更完全，假阳性克隆少；若使用单酶切线性化，需要适当延长酶切时间以减少环型质粒残留。建议酶切后取少量酶切产物进行电泳，以确保全部载体被切开。平末端和粘性末端均可。

Ezmax[®] Universal CloneMix 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），绝大部分是由未线性化环型载体转化形成。如果假阳性克隆比例较高，推荐重新制备线性化载体。

酶切完成后，应快速将内切酶 65 °C，20 min 灭活，或对目的产物纯化后用于后续的无缝拼接反应。

1.2 反向 PCR 扩增法制备线性化克隆载体

建议使用高保真 DNA 聚合酶进行载体的扩增以降低扩增突变的引入。本试剂盒与常规 PCR 的反应体系兼容；因此，如果 PCR 产物条带单一，则可直接用于后续的重组反应。如果 PCR 扩增产物有杂带，则应将 PCR 产物进行胶回收纯化后再用于无缝拼接，有利于提高重组效率。

线型 DNA 序列作为模板时无需去除；而环型质粒作为模板时则需要去除，可利用抽提模板带有甲基化修饰的特点，使用 DpnI 酶切进行去除。

Ezmax[®] Universal CloneMix

源序列，使扩增产物之间以及扩增产物与线性化克隆载体之间都具有能够相互重组的同源臂序列（15~25 bp，不包括酶切位点）。多片段重组时需保持相邻插入片段末端之间具有同源臂。

Primer F插入片段正向扩增引物设计方式：

5 - 上游载体末端同源序列+酶切位点（可选）+基因特异性正向扩增引物序列-3

Primer R 插入片段反向扩增引物设计方式：

5 - 下游载体末端同源序列+酶切位点（可选）+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 Tm值 60 ~ 65℃为佳；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 Tm值，引入的同源序列及酶切位点不应参与计算。

同源臂序列 GC含量 40% ~ 65%为佳。

引物序列合成时推荐选择 PAGE纯化方式，有利于提高克隆效率。

具体引物设计，可参照以下示例：

示例一：单个插入片段扩增引物设计（以 Hind_{III} 和 EcoR_I 双酶切线性化载体为例）

示例二：多个插入片段扩增引物设计（以 Hind_{III} 和 EcoR_I 双酶切线性化载体为例）

Ezmax[®] Universal CloneMix

2.2 PCR扩增外源 DNA片段

建议使用高保真 DNA聚合酶进行外源 DNA片段的扩增；无需考虑产物末端是否有 A加尾，不影响拼接阳性率和效率。与载体制备的流程类似，如果外源 DNA的 PCR扩增条带单一，则可以不用纯化，直接用于后续的拼接反应。但 PCR扩增产物纯度较低时，建议进行胶回收纯化，有利于提高重组效率。

如果用于制备外源 DNA的模板为环型质粒，且抗性和后续待拼接载体的抗性相同，则残留的外源质粒模板会导致大量的假阳性，影响目标克隆的挑选，因此需要去除质粒模板；可通过 DpnI 酶切法去除带有甲基化修饰的环型质粒。

Ezmax[®] Universal CloneMix

组分	体积
2 × Ezmax [®] Universal CloneMix	5 μL
线性化载体	20 ng/kb
外源 DNA插入片段	40 ng/kb 或 20 ng/kb
Nuclease-free water	Up to 10 μL

对于单片段重组：推荐载体和外源插入片段的最佳摩尔比是 n（载体）：n（插入片段）=1：2。

推荐克隆载体使用量 = [0.02× 克隆载体碱基对数] ng (0.03 pmol)

推荐插入片段使用量 = [0.04× 插入片段碱基对数] ng (0.06 pmol)

对于多片段重组：推荐载体和外源插入片段的最佳摩尔比是 n（载体）：n（插入片段）=1：1。

推荐克隆载体使用量 = [0.02× 克隆载体碱基对数] ng (0.03 pmol)

每个插入片段使用量 = [0.02× 每个片段碱基对数] ng (0.03 pmol)

推荐载体与插入片段的使用量在 10-100 ng内，当使用上述公式计算结果低于或超过这个范围时，直接使用最低/最高投入量即可。

对于单片段同源重组反应，当插入片段长度>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。

对于单片段拼接，扩增产物无非特异性条带时，可不进行纯化直接使用，加入总体积应不超过反应体系体积的 1/5，即 2 μL；多片段建议纯化后进行拼接，有利于提高重组效率。

建议设置阴性对照，即上述体系不加 2 × Ezmax[®] Universal CloneMix 若阴性对照长出很多克隆，则说明在载体制备或外源插入片段制备过程中存在载体未线性化完全、扩增模板质粒未去除彻底等问题，需要重新制备或纯化。

反应体系需在冰上制备，重组反应结束后，立即将重组产物放在冰上，以严格控制重组时间；且建议使用水浴或 PCR仪控温，反应温度或反应时长不准确都会影响克隆的效率。

4. 重组产物转化

- 1) 冰上解冻克隆用感受态细胞（如：DH5 αCompetent cell #AO4104）等。
- 2) 取上述重组反应产物 10 μL加入 100 μL感受态细胞中，轻弹混匀，冰上静置 30 min。
- 3) 42℃水浴热激 90 s后，立即置于冰上冷却 1~2 min。
- 4) 加入 900 μL SOC或 LB液体培养基（不添加抗生素），37℃ 220 rpm摇菌复壮 45 min。
- 5) 直接取 50-200 μL菌液涂板，或将复壮后的菌液 5000 rpm离心 2 min，弃掉上清，并用剩余培养液将菌体重悬，全部涂布在含有正确抗性的平板上，于 37℃培养箱中倒置培养 12~24 h。

Ezmax[®] Universal CloneMix

培养前需要将平板在超净台中晾至无明显水渍，有利于形成单克隆。

15 kb及以上的重组产物需要将培养时间延长到 24-36 h。

5. 阳性克隆鉴定

- 1) 菌落/菌液 PCR鉴定：用枪头挑取单菌落至 10 μ L 无菌水中混匀后取 1 μ L 为模板，或直接蘸取少量菌落至 PCR 体系中扩增（建议至少使用一条位于载体上的引物）；
- 2) 以质粒为模板 PCR鉴定：挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中，37°C，220 rpm 过夜摇菌后抽提质粒作为模板进行 PCR 扩增；
- 3) 酶切鉴定（若有需要）：挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中，37°C，220 rpm 过夜摇菌后抽提质粒，使用相应内切酶酶切质粒后电泳检测片段大小；
- 4) 测序：建议使用载体通用引物测序鉴定。

注意事项

1. 使用单酶切制备载体时，部分限制性内切酶产生粘性末端，导致线性化的载体转化大肠杆菌后在菌体内获得修复，长出假阳性克隆。针对这种情况，建议使用双酶切、或加大验证的克隆数量。酶切制备的线性化载体不能进行 DpnI 处理。
2. 由于重组反应体系中含有盐离子，反应产物不可以直接电击转化。若需要电击转化，则需要对反应产物进行脱盐处理。由于用于反应的 DNA 很少，不推荐使用乙醇沉淀或者胶回收，可使用适合微量 DNA 透析的滤膜进行脱盐处理。
3. 本产品仅供科研使用。

常见问题及解决方法

Ezmax[®] Universal CloneMix

平板上克隆数目少或没有长出克隆	载体与外源 DNA 的摩尔比不佳	2. 将转化产物全部涂平板。 1. 使用更精准的方法来进行外源和载体的定量（如用 NanoDrop 测定，或用琼脂糖凝胶电泳的方法来定量）； 2. 尽量维持载体和外源 DNA 片段最佳摩尔比。
	载体或外源 DNA 片段纯度较低	1. 纯化载体或外源 DNA 片段； 2. 载体和外源 DNA 片段不要溶解于 TE 中，请直接溶解于 Nuclease-free water 中。
	载体/外源 DNA 片段的同源末端序列选择不合适	1. 避免选择附近含有高级结构（如重复序列、发卡结构等）的同源序列； 2. 在 15~25 bp 的同源序列中，GC 含量太高或者太低都会影响拼接效率和成功率。建议选择 GC 含量在 50% 左右的同源序列（一般在 40%~65%）。
出现较多假阳性克隆	载体线性化处理不完全	1. 通过阴性对照检测载体是否线性化完全，可优化酶切体系，提高限制内切酶使用量并延长酶切反应时间；或者更换效率更高的限制性内切酶；胶回收酶切产物。
	环型质粒作为 PCR 扩增模板增加假阳性	1. 使用 DpnI 除去含有甲基化修饰的模板（例如从 DH5 α DH10B 等细胞中抽提的质粒模板）；胶回收酶切产物。
	PCR 扩增外源片段不特异	1. 优化 PCR 体系，提高特异性；使用高保真酶扩增；胶回收 PCR 产物。
克隆连入非目的片段	反应体系中混入了其它序列	1. 进一步纯化 PCR 产物，排除 PCR 产物不纯等因素造成的影响； 2. 使用干净的耗材，Nuclease-free water 等，避免试剂或耗材带来的污染。
	重组失败	1. 载体线性化不完全，优化酶切体系； 2. 重组末端序列重新选择。
	PCR 体系或程序不合适	1. 优化 PCR 体系，或酶切电泳验证是否插入外源片段。
菌落验证 PCR 无条带	引物不正确	1. 重新设计引物或使用通用引物验证。