

ClonExpress® Entry

One Step Cloning Kit



Vazyme Biotech Co., Ltd

销售/sales:

sales@vazyme.com

技术支持/technical support:

support@vazyme.com



www.vazyme.com

Vazyme biotech co., ltd.

使用说明书

Version 4.1

产品概要

产品组成

贮藏与保质期

实验方案

参考实例

注意事项

常见问题与解决方案

载体序列信息与测序方案

1/产品概要

ClonExpress® 快速克隆技术

ClonExpress® 技术是一种简单、快速并且高效的DNA定向克隆技术，可将插入片段PCR产物定向克隆至任意载体的任意位点。将载体在克隆位点进行线性化，并在插入片段PCR引物5'端引入线性化克隆载体末端序列，使得插入片段PCR产物5'和3'最末端分别带有和线性化克隆载体两端对应的完全一致的序列(15 bp~20 bp)。这种两端带有载体末端序列的PCR产物和线性化克隆载体按一定比例混合后，在Exnase® 的催化下，仅需反应30 min即可进行转化，完成定向克隆。克隆阳性率可达95%以上。

ClonExpress® Entry One Step Cloning Kit是在ClonExpress® 基础上研发而成的一种新型的入门克隆试剂盒。使用时需在目标DNA扩增引物5'端添加15 bp固定序列以实现扩增产物与试剂盒配套克隆载体CE Entry Vector末端的同源性。将目标DNA扩增产物和试剂盒配套载体混合后，仅需反应30 min即可直接进行转化，完成克隆。反应过程中，同源重组酶Exnase® Entry会催化扩增产物和克隆载体的高效环化，效率可达100 cfu/ng Vector，克隆阳性率可达95%以上。此外，Exnase® Entry兼容绝大多数PCR反应体系，即扩增产物可不进行任何处理直接进行重组反应。与经典入门克隆方法TA克隆相比较而言，ClonExpress® Entry一步法入门克隆技术具有适用性更广、效率更高、克隆长度更长、流程更简单等诸多优势。

产品优点

- 简单、快速、高效
- 可高效克隆50 bp~10 kb片段，克隆效率可达100 cfu/ng Vector
- 含3' dA末端的PCR产物或平末端PCR产物均可直接克隆，无需额外的加dA步骤
- 反应体系内无连接酶，自连背景极低，阳性率可达95%以上
- 重组反应具有严格的方向性，克隆产物方向确定
- 扩增产物可以不进行DNA纯化直接进行克隆
- 可进行蓝白斑筛选

应用范围

- 快速入门克隆
- 高通量克隆

2/产品组成

组 分	C114-01 (25 rxn)	C114-02 (50 rxn)
5 × CE Entry Buffer	100 µl	200 µl
Exnase Entry	50 µl	100 µl
CE Entry Vector *1	25 µl	50 µl
1 kb control insert *2	5 µl	5 µl

*1 Amp^r, linearized, 50 ng/µl

*2 40 ng/µl

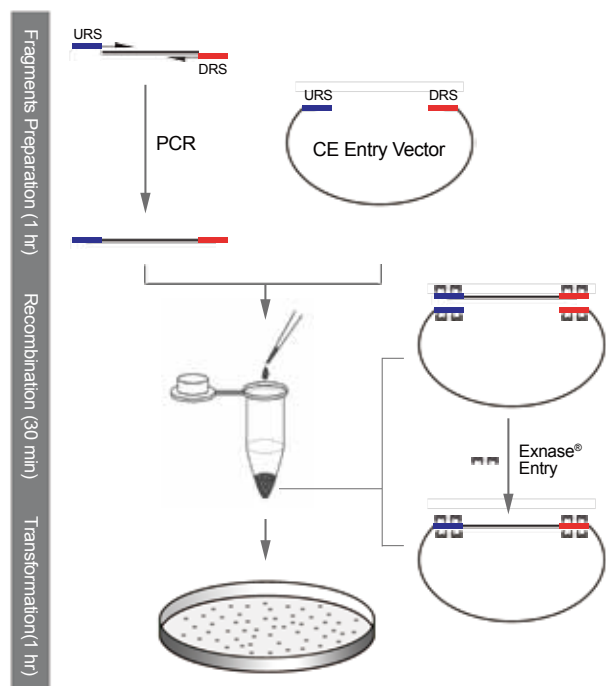
3/贮藏与保质期

本产品应置于-20℃储存，使用过程中尽量避免反复冻融。保质期为一年。

4/实验方案

4.1 实验流程概览(图一)

- 1) 插入片段扩增引物设计(参见4.2);
- 2) 插入片段PCR扩增(参见4.3);
- 3) 进行重组反应(参见4.4);
- 4) 反应产物转化、涂板(参见4.5);
- 5) 克隆鉴定(参见4.6)。



图一：使用 ClonExpress® Entry 进行入门克隆实验流程

设计插入片段扩增引物，在扩增正反向引物5'端分别添加URS (Upstream Recombination Sequence)和DRS (Downstream Recombination Sequence)。使用该对引物扩增插入片段(图，左上)。以CE Entry Vector和插入片段扩增产物进行重组反应，37℃反应30 min，实现两线状DNA的体外环化(图，中)。重组产物直接进行转化，平板上会形成数百个单克隆供后期阳性筛选(图，下)。

4.2 插入片段扩增引物设计

ClonExpress® Entry引物设计总的原则是：**通过在正反向引物5'端分别引入URS和DRS序列，使得插入片段扩增产物5'和3'最末端分别带有和CE Entry Vector两端对应的完全一致的序列，便于后续同源重组。**具体设计方案如下：

ClonExpress® Entry插入片段正向扩增引物：
5'--- GGATCTTCCAGAGAT + 基因特异性正向扩增序列---3'
URS

ClonExpress® Entry插入片段反向扩增引物：
5'--- CTGCCGTTTCGACGAT + 基因特异性反向扩增序列---3'
DRS

URS: Upstream Recombination Sequence, 上游重组序列
DRS: Downstream Recombination Sequence, 下游重组序列
基因特异性正/反向扩增序列: 即常规方法设计的正反向引物序列

注1: 因CE Entry Vector克隆位点无限制性酶切位点，所以克隆产物无法直接酶切释放插入片段；如需要进行酶切，可在URS和基因特异性正向扩增序列之间以及DRS和基因特异性反向扩增序列之间分别引入合适酶切位点，便于后续插入片段的释放。

注2: 如最终引物长度超过40 bp，我们推荐您在引物合成时选用PAGE纯化，可提高克隆成功率。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，URS和DRS序列不应参与计算。

例如，插入片段扩增引物分别为：

基因特异性正向扩增引物：5'---GGTTGGCAGGGATATTCTGGC---3'
基因特异性反向扩增引物：5'---TGCCACGATGCCTCATCACTG---3'

如克隆产物无需进行酶切释放，插入片段的ClonExpress® Entry引物设计为：

ClonExpress® Entry插入片段正向扩增引物：
5'---GGATCTTCCAGAGATGGTTGGCAGGGATATTCTGGC---3'
URS 基因特异性正向扩增引物

ClonExpress® Entry插入片段反向扩增引物：
5'---CTGCCGTTTCGACGATTGCCACGATGCCTCATCACTG---3'
DRS 基因特异性反向扩增引物

如克隆产物需要进行酶切释放，插入片段的ClonExpress® Entry引物设计为：

ClonExpress® Entry插入片段正向扩增引物：
5'---GGATCTTCCAGAGATGAATTCGGTTGGCAGGGATATTCTGGC---3'
URS EcoR I 基因特异性正向扩增引物

ClonExpress® Entry插入片段反向扩增引物：
5'---CTGCCGTTTCGACGATAAGCTTTGCCACGATGCCTCATCACTG---3'
DRS Hind III 基因特异性反向扩增引物

3) 插入片段扩增产物浓度测定

将插入片段扩增产物进行琼脂糖电泳, 与DNA分子量标准(DNA Marker)比较条带亮度以确定其近似浓度(绝大多数DNA分子量标准都有确定的DNA浓度, 图二)。由图可知, 扩增产物DNA浓度约为100 ng/μl。



图二: 插入片段PCR产物琼脂糖电泳浓度测定

M: DL5000 (5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp, Vazyme #MD102)。上样5 μl, 除1 kb条带为100 ng以外, 其余条带DNA量均为50 ng。可见, 1 kb扩增产物上样1 μl, 条带亮度与DL5000条带1 kb亮度相似(橙色框标记), 因此扩增产物DNA浓度约为100 ng/μl。

4) 反应体系配制及反应

根据4.4 进行重组反应章节中计算公式, 计算重组反应所需DNA量:

插入片段PCR产物最适使用量: $0.04 \times 1000 (1 \text{ kb}) \approx 40 \text{ ng}$

为了方便体系配制时准确吸取, 将扩增产物用ddH₂O稀释至40 ng/μl。于冰水浴中配制以下反应体系:

ddH ₂ O	12 μl
5 × CE Entry Buffer	4 μl
1 kb 插入片段扩增产物 (≈ 40 ng/μl)	1 μl
CE Entry Vector	1 μl
Exnase Entry	2 μl
Total	20 μl

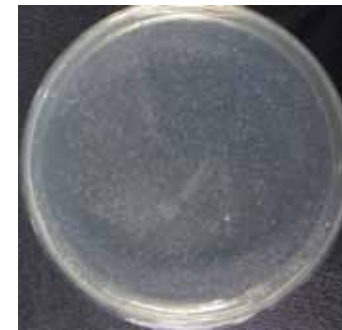
使用移液器上下吹打数次, 轻轻混匀各组分。置于37°C反应30 min。反应完成后立即将反应管置于冰水浴中, 冷却5 min。

5) 重组产物转化、涂板

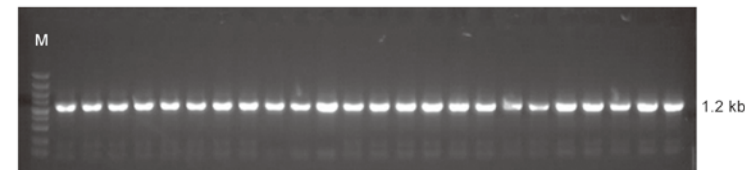
参见4.5 反应产物转化、涂板。所用感受态转化效率为10⁸ cfu/μg (Vazyme #C503)。转化完成后, 取100 μl菌液涂板。

6) 克隆鉴定

过夜培养后, 重组反应转化平板上形成数千个单克隆(图三)。挑取重组反应转化平板上24个克隆进行菌落PCR鉴定(Taq Master Mix, Vazyme #P112), 鉴定引物使用测序引物M13F/M13R。如果克隆正确, 应有约1.2 kb PCR条带出现。经鉴定, 所挑24个克隆全部为阳性克隆(图四)。



图三: 转化后过夜培养的平板



图四: 菌落PCR琼脂糖电泳图

6/ 注意事项

下表列出了使用ClonExpress® Entry进行入门克隆时主要注意事项(表二):

实验步骤	推荐这样做	不应该这样做
插入片段引物设计	按照4.2所示进行设计	URS或DRS添加错误
插入片段PCR扩增	进行高特异性扩增反应	扩增不特异, 杂带较多
插入片段扩增产物DNA纯化	在进行较大片段(>5 kb)克隆时, 使用氨苄抗性环状质粒作为扩增模板时、当扩增产物不特异时, DNA应进行胶回收纯化	在进行较大片段(>5 kb)克隆、使用氨苄抗性环状质粒作为扩增模板时、或者当扩增产物不特异时, DNA未纯化直接使用
插入片段扩增产物DNA浓度测定	琼脂糖电泳检测	吸光度法检测
重组反应体系配制	在冰水浴中配制; 根据实际浓度, 按照重组反应所需最适DNA量配制	在室温下配制; 不考虑DNA浓度随意配制
进行重组反应	在温控比较精确的仪器内(PCR仪或水浴锅), 37°C反应30 min	反应温度偏离37°C太多、反应时间不足或者超过30 min
终止重组反应	反应完成后立即将反应管置于冰水浴中冷却5 min	反应完成后室温放置
转化	冷却后的反应产物应在1 hr内进行转化, 转化之前应一直保持冰水浴低温。如需储存, 于-20°C进行	冷却后的反应产物置于室温长时间放置后进行转化; 4°C长时间储存后进行转化
菌落PCR	使用M13F/M13R进行菌落PCR鉴定	使用两条基因特异性引物进行扩增鉴定

表二: 使用ClonExpress® Entry 进行入门克隆时主要注意事项

7/常见问题与解决方案

1 平板上长不出克隆或克隆数目很少

a). 感受态效率低:

使用新制备或妥善冻存的感受态细胞, 确保转化效率 $>10^7$ cfu/ μ g。每次可设置一组转化质粒的对照实验, 以检测感受态细胞的转化效率。

b). 插入片段扩增产物的使用量不足或过量:

尽量按照推荐的DNA使用量配制反应体系。**请务必预先检测插入片段PCR产物的浓度。常用的吸光度测量法极易受DNA纯度、DNA稀释液pH等因素影响, 测定值和DNA实际浓度往往偏差非常大。因此, 我们强烈推荐您通过琼脂糖电泳来测定样品中的DNA浓度(测定方法参见5/参考实例)。**

c). 插入片段不纯, 抑制反应:

未纯化的扩增产物进行克隆时使用总体积不应超过4 μ l (反应体系体积1/5)。尝试对PCR产物进行胶回收或柱纯化。重组反应体系中应尽量避免金属络合剂(如EDTA)的带入。因此, 我们推荐您将DNA纯化产物溶解在pH8.0的ddH₂O中保存(常规胶回收试剂盒中的洗脱液可用pH8.0的ddH₂O替代), 请勿使用TE进行DNA保存。

d). 感受态细胞中加入了过多的反应产物: 反应产物的转化体积不应超过感受态细胞体积的1/10, 否则会降低转化效率。

e). 出现转化抑制效应: 当转化的DNA浓度太高时, 会抑制转化反应。取1/5重组反应产物进行转化。

2 多数克隆不含插入片段

反应体系中混入了相同抗性的质粒:

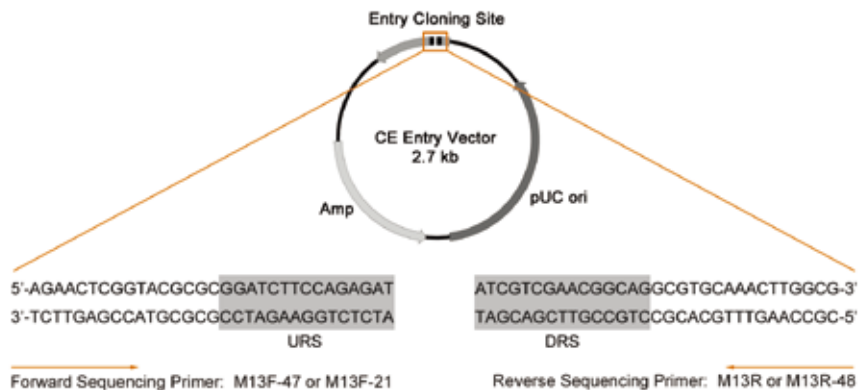
PCR扩增模板为氨苄抗性环状质粒。当扩增产物直接用于重组反应时, 残留环状质粒模板会产生较高的转化背景。尽量使用预线性化质粒作为扩增模板、扩增产物进行DpnI消化、扩增产物进行胶回收纯化, 都可以有效减少环状模板质粒残留。

3 克隆含有不正确的插入片段

PCR产物混有非特异扩增产物:

优化PCR体系, 提高特异性; 胶回收纯化PCR产物; 鉴定更多的克隆。

8/载体序列信息与测序方案



因CE Entry Vector起源于PUC19载体骨架, 测序时使用PUC19通用测序引物即可, 推荐测序引物如下:

正向测序: M13F-47或者M13F-21

反向测序: M13R或者M13R-48

查询CE Entry Vector完整的序列信息, 请登录 www.vazyme.com