

---

# Clone-Simplifier™ Enzyme Kit

## 快速克隆试剂盒

## 使用说明书

产品编号：M1261

M1261 50 次

---

上海美季生物技术有限公司

上海市浦东区张江高科技园区 720 号 1 号楼 218 室

[www.mbchemic.com](http://www.mbchemic.com)

Mbchem™ 品牌为上海美季生物技术有限公司所有

电话：86-021-51873168 传真：86-021-51875086-800

本产品仅供科学研究使用

This product is for research use only. Not for  
diagnostic use.

## 目 录

<b>1. 产品概要</b> .....	<b>3</b>
<b>2. 产品组成</b> .....	<b>4</b>
<b>3. 贮藏与保质期</b> .....	<b>4</b>
<b>4. 实验方案</b> .....	<b>4</b>
<b>4.1 实验流程概览</b> .....	<b>4</b>
<b>4.2 制备线性化载体</b> .....	<b>5</b>
<b>4.3 制备 PCR 产物</b> .....	<b>5</b>
<b>4.4 体系配制及反应</b> .....	<b>7</b>
<b>4.5 转化</b> .....	<b>8</b>
<b>4.6 克隆鉴定</b> .....	<b>8</b>
<b>5. 参考实例</b> .....	<b>9</b>
<b>6. 常见问题与解决方案</b> .....	<b>11</b>
<b>7. 相关产品</b> .....	<b>13</b>

上海美季生物技术有限公司  
上海市浦东区张江高科技园区 720 号 1 号楼 218 室  
[www.mbchemic.com](http://www.mbchemic.com)  
Mbchem™ 品牌为上海美季生物技术有限公司所有  
电话: 86-021-51873168 传真: 86-021-51875086-800

本产品仅供科学研究使用

This product is for research use only. Not for b  
diagnostic use.

---

## 1. 产品概要

### Clone-Simplifier™ 快速克隆技术

Clone-Simplifier™ 快速克隆技术是一种简单、快速并且高效的 PCR 克隆技术，可以将 PCR 产物定向克隆至任意线性化载体的任意位点中。在设计引物时，只需在 5' 端加上 15 个碱基与线性化载体末端同源的序列即可。PCR 产物可通过任意 DNA 聚合酶（Taq 酶或高保真酶）扩增获得，载体线性化可以通过核酸内切酶完成（也可以直接通过 PCR 获得）。PCR 产物和线性化载体的混合物在本产品（CS-Enzyme 酶）的催化下，仅需在室温反应 30 分钟即可转化，阳性率可达 95% 以上。

### 产品优点

- 一、 简单、快速、高效，适用于任何载体
- 二、 PCR 产物无需酶切；不依赖于连接酶及磷酸酶
- 三、 对插入片段大小无要求，可有效克隆 10 kbp 片段
- 四、 可一次性插入多片段（片段首尾需有 15 bp 的重叠序列）

### 应用范围

- 快速克隆
- 高通量克隆
- 定点突变
- 基因合成

---

上海美季生物技术有限公司

上海市浦东区张江高科技园区 720 号 1 号楼 218 室

[www.mbchemic.com](http://www.mbchemic.com)

Mbchem™ 品牌为上海美季生物技术有限公司所有

电话：86-021-51873168 传真：86-021-51875086-800

本产品仅供科学研究使用

This product is for research use only. Not for diagnostic use.

## 2. 产品组成

组分	M1261-1 (20 次)	M1261-2 (50 次)
10×Clone-Simplifier™ Buffer	40 μl	100 μl
CS-Enzyme	40 μl	100 μl

## 3. 贮藏与保质期

本产品应置于 - 20℃ 储存；使用过程中请尽量避免反复冻融。保质期为半年。

## 4. 实验方案

### 4.1 实验流程概览 (图一)

- 1) 引物设计
- 2) 目标片段 PCR、目标载体酶切线性化 (或 PCR)
- 3) 目标片段 PCR 产物、目标载体线性化产物回收 (胶回收或者乙醇沉淀)
- 4) CS-Enzyme 反应体系配制，25℃ 反应 30 分钟，置于冰水浴停止反应
- 5) 反应产物转化、涂板
- 6) 克隆鉴定

上海美季生物技术有限公司

上海市浦东区张江高科技园区 720 号 1 号楼 218 室

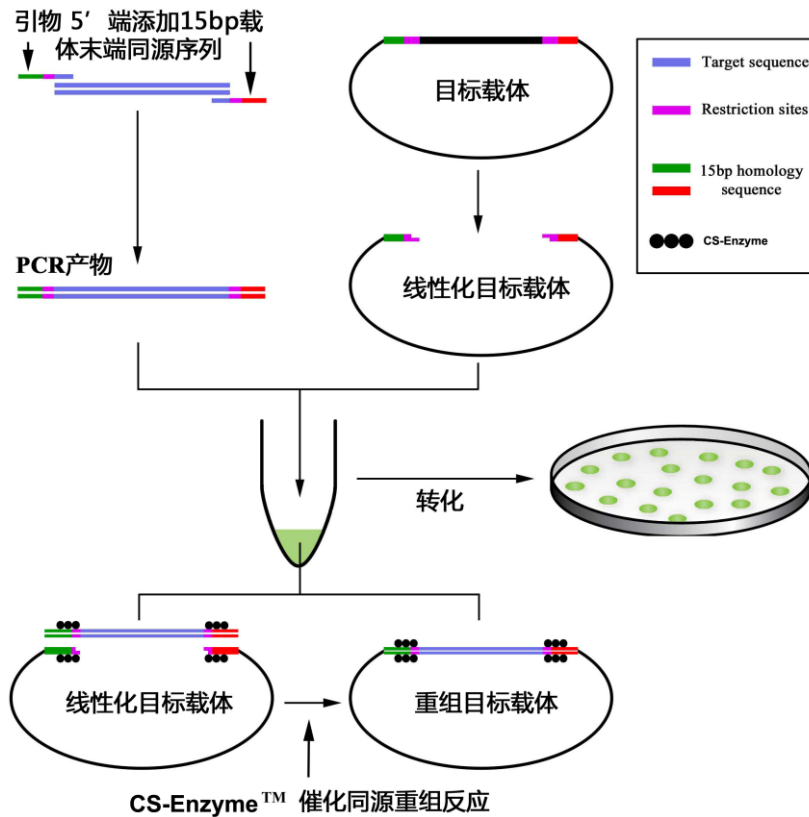
[www.mbchemic.com](http://www.mbchemic.com)

Mbchem™ 品牌为上海美季生物技术有限公司所有

电话: 86-021-51873168 传真: 86-021-51875086-800

本产品仅供科学研究使用

This product is for research use only. Not for diagnostic use.



图一：实验流程概览

## 4.2 制备线性化载体

载体的完全线性化对于 Clone-Simplifier™ 成功完成片段克隆来说至关重要。不完全线性化的载体将会导致高背景的产生。线性化载体可通过限制性内切酶酶切（单酶切或双酶切均可）或 PCR 获得。

**注意：**我们强烈建议您用割胶回收的方式纯化线性化载体。

## 4.3 制备 PCR 产物

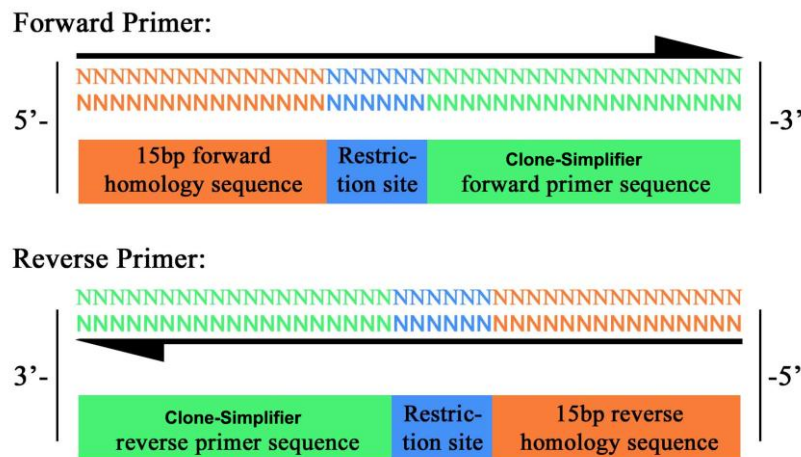
### 1) 引物设计

上海美季生物技术有限公司  
 上海市浦东区张江高科技园区 720 号 1 号楼 218 室  
[www.mbchem.com](http://www.mbchem.com)  
 Mbchem™ 品牌为上海美季生物技术有限公司所有  
 电话：86-021-51873168 传真：86-021-51875086-800

本产品仅供科学研究使用

This product is for research use only. Not for diagnostic use.

Clone-Simplifier™ 引物从 5' -3' 依次包含三个部分：和线性化载体末端同源的 15bp 序列，酶切位点，以及目的基因序列。具体设计如图二所示，并参考 5. 操作实例。



图二：Clone-Simplifier™ 引物设计示意图

**注意：**如需在引物上保留酶切位点，不需要考虑载体酶切产生的是粘性末端、平末端或是酶切后酶切位点有多少个碱基仍然留在载体上，只需将酶切位点序列全部包括即可，这样插入目标片段后预留的酶切位点即会是完整的；此外，若引物总长度超过 40 个碱基，建议您在引物合成时选用 PAGE 纯化，可提高克隆成功率。

## 2) PCR 扩增及 PCR 产物的纯化

目的片段可用任意 PCR 酶 (Taq 酶或高保真酶) 扩增，不用担心产物末端加 A 的情况。注意：计算引物退火温度时，只需计算与模板互补的序列的 Tm 值，引物 5' 端附加序列不应参与计算。

上海美季生物技术有限公司

上海市浦东区张江高科技园区 720 号 1 号楼 218 室

[www.mbchemic.com](http://www.mbchemic.com)

Mbchem™ 品牌为上海美季生物技术有限公司所有

电话：86-021-51873168 传真：86-021-51875086-800

本产品仅供科学研究使用

This product is for research use only. Not for diagnostic use.

PCR 结束后，建议您取少量产物先走琼脂糖电泳检验产量和特异性。如果扩增出单一条带，可用乙醇沉淀或离心柱纯化剩余 PCR 产物；如果有非特异条带，则需要割胶回收 PCR 产物。

**注意：**如果 PCR 模板是质粒，且抗性和目的载体相同，建议割胶回收 PCR 产物，否则转化后反应体系中残留的模板质粒会导致较高的背景。

**注意：**无论您使用乙醇沉淀还是离心柱纯化 PCR 产物，我们强烈推荐回收产物最后溶解在灭菌蒸馏水中(大部分 DNA 柱式纯化试剂盒的洗脱液可以用 PH 8.0 的蒸馏水代替)，这样有助于提高最终克隆成功率。

#### 4.4 体系配制及反应

将下列组分依次加到无菌的 1.5 ml Eppendorf 管或 PCR 管的管底。如果不慎将液体粘在管壁，请务必通过短暂离心使其沉入管底。

灭菌蒸馏水	Up to 20 $\mu$ l
10 $\times$ Clone-Simplifier™ Buffer	2 $\mu$ l
线性化载体*	100-400 ng
PCR 产物*	50-200 ng
CS-Enzyme	2 $\mu$ l

\* (线性化载体用量参见表一)

**注意：**配制反应体系前请务必通过琼脂糖电泳检测插入片段以及线性化载体大小、浓度正确与否

**注意：**如反应体系的配制过程超过 5 分钟，请于冰水浴上进行

**注意：**请您在反应体系中其他成分添加完成后再加入 CS-Enzyme。

上海美季生物技术有限公司

上海市浦东区张江高科技园区 720 号 1 号楼 218 室

[www.mbchemic.com](http://www.mbchemic.com)

Mbchem™ 品牌为上海美季生物技术有限公司所有

电话: 86-021-51873168 传真: 86-021-51875086-800

本产品仅供科学研究使用

This product is for research use only. Not for diagnostic use.

用移液器将组分轻轻混匀。25°C 反应 30 分钟后，在冰上放置 5 分钟，即可转化；也可将反应液在-20°C保存，待需要时解冻转化即可。

**注意：**因本产品对温度的敏感性，因此推荐您在 PCR 仪或者水浴锅等温控比较精确的容器内进行反应。经测试，反应时间以 30 分钟为佳，反应时间不足或者太长都会影响最终克隆效率。

载体大小	推荐量
<4 kb	100 ng
4-6 kb	100-150 ng
6-10 kb	200 ng
>10 kb	最多至 400 ng

表一：Clone-Simplifier™ 反应推荐的载体用量

**注意：**推荐插入片段和载体的摩尔比在 2:1-1:1 之间，插入片段的纳克数可通过载体的纳克数计算而得。

#### 4.5 转化

取 10μl 反应液，加入到 100 μl Top 10 感受态细胞中（其他菌种感受态也可），轻弹管壁数下混匀，在冰上放置 30 分钟。42°C 热激 45-90 秒，**冰水浴** 孵育 2 分钟。加入 900 μl SOC 或 LB 培养基，37°C 孵育 45 分钟。取 100μl 菌液均匀涂布在含有适当抗生素的平板上。将平板倒置在 37°C 培养箱过夜。

**注意：**建议使用转化效率 > 10<sup>8</sup> cfu/μg 的感受态细胞。如果感受态效率 < 10<sup>8</sup> cfu/μg（例如用 CaCl<sub>2</sub> 法新鲜制备的感受态效率通常在 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>cfu/μg），

上海美季生物技术有限公司

上海市浦东区张江高科技园区 720 号 1 号楼 218 室

[www.mbchem.com](http://www.mbchem.com)

Mbchem™ 品牌为上海美季生物技术有限公司所有

电话：86-021-51873168 传真：86-021-51875086-800

本产品仅供科学研究使用

This product is for research use only. Not for diagnostic use.



---

请将在 37°C 孵育过的菌液在 5000 rpm 离心 3 分钟收集菌体，用 100 μl LB 培养基重悬后涂板。

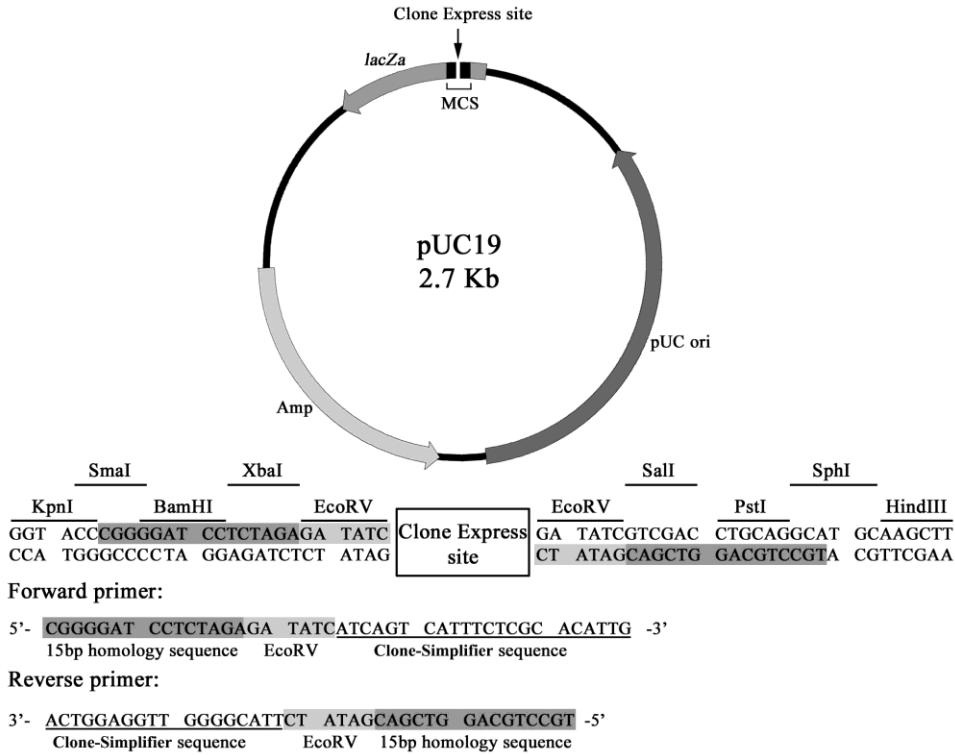
#### 4.6 克隆鉴定

鉴定克隆最方便快捷的办法是菌落 PCR。用无菌的枪头或牙签将单个菌落挑至 20-50 μl LB 培养基中混匀，直接取 1 μl 作为 PCR 模板。建议您至少用一条通用的测序引物鉴定，这样可以避免 PCR 假阳性的产生。将 PCR 阳性菌落的剩余菌液加到含有适当抗生素的 LB 培养基中培养过夜，提取质粒做后续的鉴定。

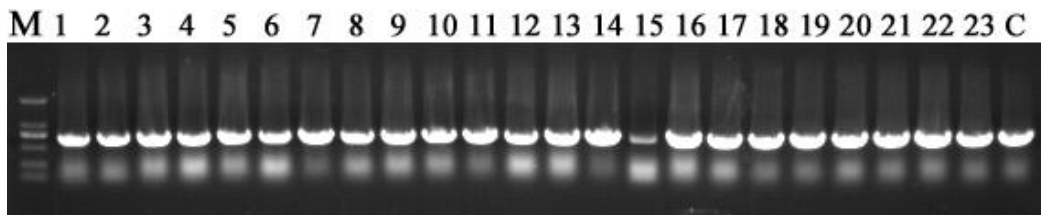
#### 5. 参考实例（对照反应）

由 PCR 扩增出线性化的 pUC19 载体，在其两个末端各引入一个 EcoR V 酶切位点以方便后期质粒的酶切鉴定。从 Lambda DNA 中扩增出 500bp 片段插入到 EcoR V 位点中。线性化载体的多克隆位点及引物设计如 **图三** 所示。

每次对照反应插入片段和载体各加 1 μl；按照 4.3 及 4.4 节的步骤操作，使用转化效率 > 10<sup>8</sup> cfu/μg 的感受态细胞，平板上可长出数百个菌落，阳性率 > 95%。



**图三：阳性对照反应载体多克隆位点图谱及引物设计**



**图四：部分菌落 PCR 鉴定**

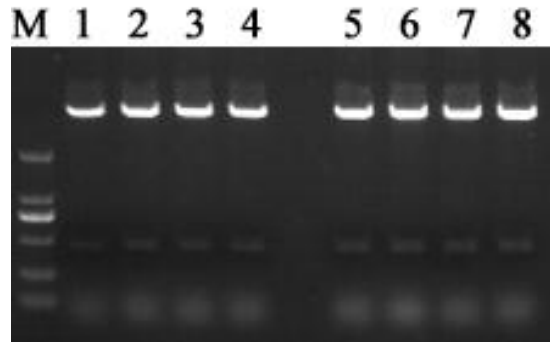
M: BU-DL2000 DNA Marker。1-23: 23 个不同的菌落。C: 插入阳性对照。  
如果菌落为载体自连，则 PCR 条带应为 200 bp；如果片段插入载体，则 PCR

上海美季生物技术有限公司  
上海市浦东区张江高科技园区 720 号 1 号楼 218 室  
[www.mbchemic.com](http://www.mbchemic.com)  
Mbchem™ 品牌为上海美季生物技术有限公司所有  
电话: 86-021-51873168 传真: 86-021-51875086-800

本产品仅供科学研究使用

This product is for research use only. Not for diagnostic use.

条带应为 700bp。



图五：部分克隆质粒 EcoRV 酶切鉴定

M: BU-DL2000 DNA Marker。1-8: 8 个不同的单克隆质粒。如果片段插入载体，则应该有 500bp 酶切特征带出现。

## 6. 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/ $\mu$ 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) **载体和插入片段的量不够，或者比例失调**：尽量提高载体和插入片段的浓度，并根据表一所推荐的量和比例加入反应体系。
  - c) **载体和插入片段不纯，抑制反应**：线性化载体 PCR 产物都需要纯化。如果用乙醇沉淀的方法纯化 PCR 产物，请用 70%乙醇洗涤。最终产物溶解在灭菌蒸馏水中可以显著提高克隆效率。
  - d) **感受态细胞中加入了过多的反应混合物**：确保加入的反应混合物的体积不超过感受态细胞体积的 1/10，否则会降低转化效率。如有必要，可以适当增大感受态细胞的体积。

上海美季生物技术有限公司

上海市浦东区张江高科技园区 720 号 1 号楼 218 室

[www.mbchemic.com](http://www.mbchemic.com)

Mbchem™ 品牌为上海美季生物技术有限公司所有

电话: 86-021-51873168 传真: 86-021-51875086-800

本产品仅供科学研究使用

This product is for research use only. Not for diagnostic use.

2) 多数克隆不含插入片段

a) **载体线性化不完全**：即使是痕量未完全酶切的载体也会产生很高的背景。胶回收线性化载体或者改用 PCR 的方法来制备线性化载体，都可以有效避免载体酶切不完全而导致的克隆失败。

b) **反应体系中混入了相同抗性的质粒**：如果 PCR 的模板是质粒且抗性与目的载体相同，只有用胶回收才能有效去除残留的模板。

3) 克隆含有不正确的插入片段

a) **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 PCR 产物；鉴定更多的克隆。

b) **载体线性化不完全**：如果线性化载体不是由空载体酶切制备，而是由已插入其他不同片段的载体酶切制备而成，酶切不完全将导致很高的背景，使克隆中含有不正确的插入片段。胶回收线性化载体或者改用 PCR 的方法来制备线性化载体，都可以有效避免此类情况发生。

4) **特别提示**

因 CS-Enzyme 具有高效的催化 DNA 末端同源重组的活性，因此当线性化载体两个末端具有一定长度的同源序列时（即使同源序列长度没有 15bp，例如两个相同的酶切位点，图三），也会有一定几率发生重组，最终造成载体自连（例如参考实例中，载体自连几率为 5%），降低克隆阳性率。这种情况多发生在线性化载体由 PCR 产物制备而成的实例中。因此在引物设计时应当尽量避免此类情况发生。

---

上海美季生物技术有限公司

上海市浦东区张江高科技园区 720 号 1 号楼 218 室

[www.mbchem.com](http://www.mbchem.com)

Mbchem™ 品牌为上海美季生物技术有限公司所有

电话：86-021-51873168 传真：86-021-51875086-800

本产品仅供科学研究使用

This product is for research use only. Not for diagnostic use.