

# ClonExpress<sup>®</sup> II

## One Step Cloning Kit



### Vazyme Biotech Co., Ltd

网站/Web: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

咨询热线/Tel: 400-600-9335

销售/Sales: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com)

技术支持/Support: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com)

技术服务/Service: [service@vazyme.com](mailto:service@vazyme.com)



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

Vazyme biotech co., ltd.

使用说明书

Version 5.1

# 目录Catalog

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

## 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末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® II是新一代的重组克隆试剂盒，该试剂盒中包含有重组反应所需缓冲液和重组酶Exnase® II。和上一代产品相比，Exnase® II中添加了独特的重组增强因子。一方面，这种增强因子可以显著提高重组克隆效率，即便使用低效率感受态细胞( $10^7$  cfu/ $\mu$ g)也可实现高效克隆(100 cfu/ng Vector)。另一方面，Exnase® II还兼容常规酶切、PCR反应体系。克隆载体酶切产物或PCR产物和插入片段PCR扩增产物可以不进行DNA纯化直接用于重组克隆，极大的简化了实验步骤。

产品优点

- 简单、快速、高效
- 适用于向几乎任何载体在任何位点进行定向克隆
- 无需考虑插入片段自身携带的酶切位点
- 可高效克隆50 bp~10 kb片段
- 不依赖于连接酶及磷酸酶，克隆阳性率可达95%以上
- 线性化克隆载体和PCR产物可不进行纯化直接克隆

应用范围

- 快速克隆
- 高通量克隆
- 无缝克隆
- DNA定点突变

## 2/产品组成

组 分	C112-01 (25 rxn)	C112-02 (50 rxn)
5 × CE II Buffer	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Exnase® II	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
500 bp control insert (25 ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
pUC19 control vector, linearized (50 ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

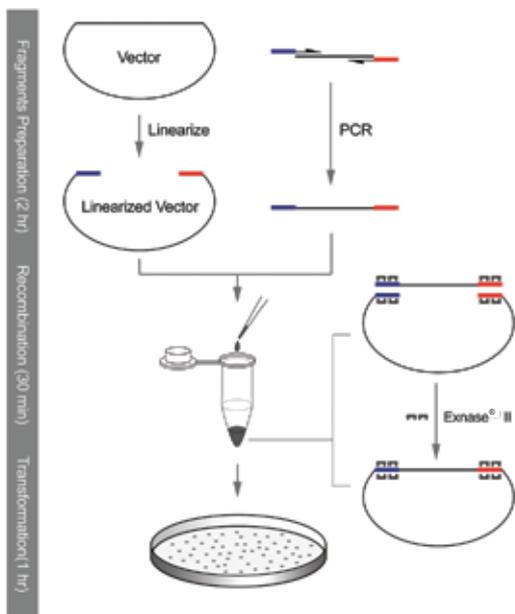
### 3/贮藏与保质期

本产品应置于-20°C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). 线性化克隆载体制备(参见4.2);
- 2). 插入片段扩增引物设计(参见4.3);
- 3). 插入片段PCR扩增(参见4.4);
- 4). 进行重组反应(参见4.5);
- 5). 反应产物转化、涂板(参见4.6);
- 6). 克隆鉴定(参见4.7)。



图一：使用 ClonExpress® II 进行基因克隆实验流程用于重组反应的克隆载体必须为线性化载体。该线性化载体可通过内切酶消化环状载体获得，也可由反向PCR扩增环状载体获得(图，上左)。插入片段由PCR扩增制备。所用扩增引物在设计时需在其5'端添加线性化克隆载体末端序列(图中以红色和蓝色标记)。使用该引物对扩增插入片段，扩增产物5'和3'最末端的序列分别和线性化克隆载体两末端序列完全一致(图，上右)。以线性化克隆载体和插入片段扩增产物配制重组反应体系，37°C反应30 min即可完成重组反应，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 制备线性化载体

选择合适的克隆位点，并对克隆载体进行线性化。我们推荐您尽量选择无重复序列且GC含量均匀的区域进行克隆。当载体克隆位点上下游20 bp区域内GC含量均在40%~60%范围之内时，重组效率将达到最大。

克隆载体线性化方式可以为限制性内切酶酶切消化，也可以为反向PCR扩增。

##### A 线性化克隆载体由酶切制备

双酶切线性化：线性化完全，转化背景(假阳性克隆)低。推荐使用。

单酶切线性化：线性化程度较差。可适当延长酶切时间以降低转化背景。

注：ClonExpress® II重组反应体系内无DNA连接酶，不会发生载体自连反应。因此，即使是以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)是由未线性化环状载体转化而形成的。如这种假阳性克隆比例较高，应重新制备线性化克隆载体。

ClonExpress® II 重组反应体系兼容几乎所有的酶切反应体系。克隆载体酶切产物加热失活内切酶(参见内切酶使用说明书，例如Hind III，65°C孵育20 min完全失活)后可直接用于重组反应。

##### B 线性化克隆载体由反向PCR扩增制备

我们推荐您使用高保真聚合酶进行载体扩增(Phanta® Super-Fidelity DNA Polymerase, Vazyme, P501)以减少扩增突变的引入。PCR扩增模板应尽量使用预线性化质粒，以防止残留环状质粒模板对克隆阳性率的影响。

ClonExpress® II重组反应体系兼容常规PCR反应体系。因此，如扩增模板为预线性化质粒且PCR产物电泳条带单一，扩增产物可以无需纯化直接用于重组反应。

克隆载体酶切产物或 PCR 扩增产物DNA 纯度较低且有可能含有未线性化环状质粒，直接使用进行重组反应时，重组效率、克隆阳性率都会有所降低。因此，在进行较大片段(>5 kb)克隆时，我们推荐您使用高质量的试剂盒对线性化克隆载体进行胶回收纯化，以提高 DNA 纯度并去除一部分未线性化的环状载体(其电泳位置不同于线性化克隆载体)。不同方式制备的线性化克隆载体的使用方式可查阅表一。

线性化载体制备方式	模板类型	快速实验方案	最佳实验方案
酶切消化制备	环状质粒	加热失活内切酶后直接使用	胶回收
PCR制备	扩增特异	环状质粒	DpnI 消化后直接使用(降解扩增模板)
		预线性化质粒、基因组、cDNA	直接使用
	有明显非特异性扩增		胶回收

表一：线性化克隆载体的使用方式

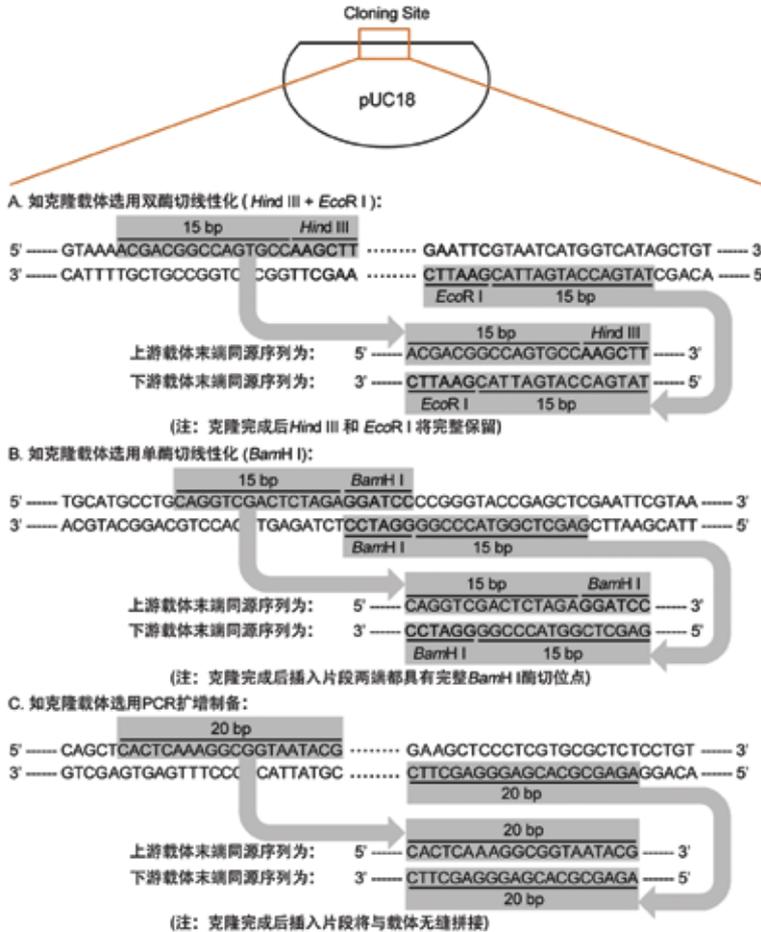
注：直接使用酶切产物或扩增产物进行重组反应时，使用体积不应超过4 μl (重组反应总体积的1/5)。

#### 4.3 插入片段扩增引物设计

ClonExpress® II 引物设计总的原则是：通过在引物5'端引入线性化克隆载体末端同源序列，使得插入片段扩增产物5'和3'最末端分别带有和线性化克隆载体两末端对应的完全一致的序列(15 bp~20 bp)。以pUC18作为克隆载体为例，引物具体设计方案如图二所示。

插入片段正向扩增引物设计方式为：  
**5' ----- 上游载体末端同源序列 + 基因特异性正向扩增序列 ----- 3'**  
 插入片段反向扩增引物设计方式为：  
**3' ----- 基因特异性反向扩增序列 + 下游载体末端同源序列 ----- 5'**

基因特异性正/反向扩增序列即常规插入片段正/反向扩增引物序列；上游/下游载体末端同源序列为线性化克隆载体最末端序列(用于同源重组)，添加方法参见以下实例：



图二：重组引物设计方案

注：如最终引物长度超过40bp，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，载体末端同源序列不应参与计算。

#### 4.4插入片段PCR扩增

插入片段可用任意PCR酶(Taq酶或高保真酶)扩增，无需考虑产物末端有无A加尾(重组过程中将被去除，在最终载体中不会出现)。我们推荐您使用高保真聚合酶进行扩增(Phanta® Super-Fidelity DNA Polymerase, Vazyme, P501)，以减少扩增突变的引入。

PCR结束后，取少量产物进行琼脂糖电泳以检验扩增产量和特异性。ClonExpress® II重组反应体系兼容常规PCR反应体系。因此，如扩增模板不是与克隆载体抗性相同的环状质粒，且PCR产物电泳条带单一，扩增产物可以无需纯化直接用于重组反应。

PCR扩增产物DNA纯度较低，直接使用进行重组反应时，重组效率、克隆阳性率都会有所降低。因此，在进行较大片段(>5 kb)克隆实验时，我们推荐您使用高质量的试剂盒对扩增产物进行胶回收纯化以提高DNA纯度。插入片段扩增产物的使用方式可查阅表二。

PCR扩增情况	PCR模板类型	快速实验方案	最佳实验方案
扩增特异	与克隆载体抗性相同的环状质粒	DpnI 消化后直接使用*	胶回收或DpnI 消化后胶回收
	预线性化质粒、基因组、cDNA	直接使用	胶回收
有明显非特异性扩增		胶回收	

表二：扩增产物推荐使用方式

注：直接使用扩增产物进行重组反应时，使用体积不应超过4 μl (重组反应总体积的1/5)

\* 当线性化克隆载体为酶切制备时，插入片段扩增产物经DpnI消化结束后应置于85℃加热20min失活DpnI 活性，以避免重组反应时残留DpnI 对克隆载体的降解。

#### 4.5进行重组反应

于冰水浴中配制如下反应体系。如果不慎将液体粘在管壁，可通过短暂离心使其沉入管底。

ddH <sub>2</sub> O	Up to 20 μl
5×CE II Buffer	4 μl
线性化克隆载体	50~200 ng
插入片段扩增产物	20~200 ng
Exnase® II	2 μl

ClonExpress® II 重组反应体系最适克隆载体使用量为0.03 pmol；最适克隆载体与插入片段摩尔比为1:2，即最适插入片段使用量为0.06 pmol。这些摩尔数对应的DNA质量可由以下公式粗略计算获得：

$$\text{最适克隆载体使用量} = [0.02 \times \text{克隆载体碱基数}] \text{ng} (0.03 \text{ pmol})$$

$$\text{最适插入片段使用量} = [0.04 \times \text{插入片段碱基数}] \text{ng} (0.06 \text{ pmol})$$

例如，将长度为2 kb的插入片段克隆至长度为5 kb的克隆载体时，克隆载体的最适使用量应为：0.02×5000 = 100 ng；插入片段最适使用量应为：0.04×2000 = 80 ng。

注意：1. 当插入片段长度大于克隆载体时，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。  
2. 线性化克隆载体的使用量应在50~200 ng之间；插入片段扩增产物的使用量应在20~200 ng之间。当使用上述公式计算DNA最适使用量超出这个范围时，直接选择最低/最高使用量即可。例如，插入片段长度为100 bp，最适使用量计算值为4 ng，实际反应体系内使用量应为插入片段扩增产物最少使用量20 ng。  
3. 线性化克隆载体和插入片段扩增产物不进行DNA纯化直接使用时，加入总体积应不超过反应体系体积的1/5，即4  $\mu$ l。

ClonExpress® II 快速克隆试剂盒中提供500 bp control insert (25 ng/ $\mu$ l) 和pUC19 control vector, linearized (50 ng/ $\mu$ l) 各5  $\mu$ l，必要时可进行阳性对照反应，每次反应各加1  $\mu$ l。

体系配制完成后，用移液器上下轻轻吹打几次混匀各组分，避免产生气泡(请勿剧烈震荡或者涡旋混匀)。置于37°C反应30 min。待反应完成后，立即将反应管置于冰水浴中冷却5 min。之后，反应产物可直接进行转化；也可储存于-20°C，待需要时解冻转化。

注意：我们推荐您在PCR仪或者水浴锅等温控比较精确的仪器上进行反应。重组效率在反应30 min左右达到最高，反应时间不足或者太长都会降低克隆效率。

#### 4.6 反应产物转化、涂板

取20  $\mu$ l冷却反应液，加入到200  $\mu$ l感受态细胞中，轻弹管壁数下混匀，在冰上放置30 min。42°C热激45~90秒，冰水浴孵育2 min。加入900  $\mu$ l SOC或LB培养基，37°C孵育10 min充分复苏。37°C摇菌45 min。取100  $\mu$ l菌液均匀涂布在含有适当抗生素的平板上。将平板倒置，于37°C过夜培养。

注意：我们推荐您使用转化效率 $>10^8$  cfu/ $\mu$ g的感受态细胞。如果感受态转化效率 $<10^8$  cfu/ $\mu$ g(例如用CaCl<sub>2</sub>法新鲜制备的感受态转化效率通常在 $10^6$ - $10^7$  cfu/ $\mu$ g之间)，请将培养菌液在5000 rpm离心3 min收集菌体，用100  $\mu$ l LB培养基重悬后全部涂板。

#### 4.7 克隆鉴定

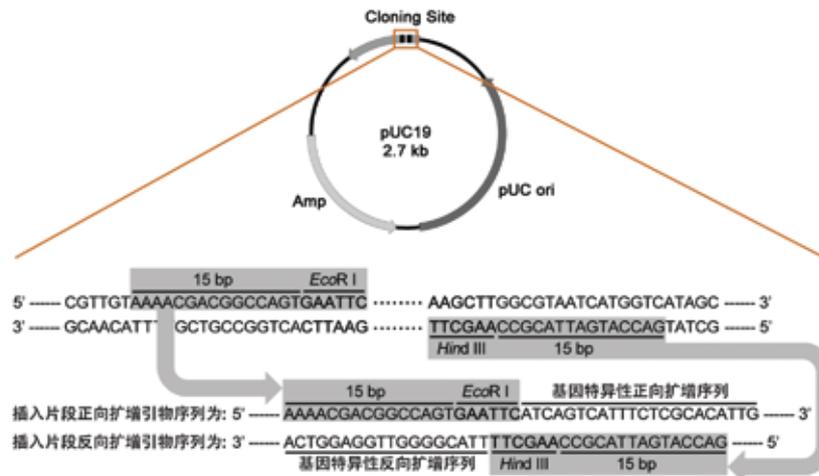
最方便快捷的方法是菌落PCR。用无菌的枪头或牙签将单个菌落挑至20~50  $\mu$ l LB培养基中混匀，直接取1  $\mu$ l作为PCR模板。我们推荐您至少用一条通用测序引物进行菌落PCR，这样可以避免PCR假阳性的产生。将PCR阳性菌落的剩余菌液接种至含有适当抗生素的LB培养基中培养过夜，提取质粒做后续的鉴定。

## 5/参考实例

实验目标：在pUC19载体的EcoR I 和Hind III 酶切位点间插入一段500 bp的基因。

### 1) 插入片段引物设计

根据图二双酶切引物设计方案，设计引物如下(图三)：



图三：参考实例插入片段扩增引物设计

### 2) 克隆载体线性化

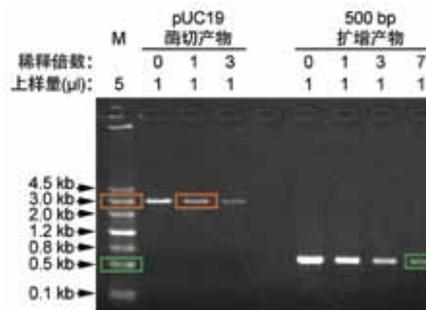
将2  $\mu$ g环状pUC19质粒加入到20  $\mu$ l酶切反应体系中，37°C酶切2 hr。限制性内切酶使用量为EcoR I 和Hind III各1  $\mu$ l。酶切完成后，将酶切产物置于65°C加热20 min，失活内切酶。

### 3) 插入片段PCR扩增

使用Phanta® Super-Fidelity DNA Polymerase (Vazyme, P501) 对插入片段进行扩增，扩增模板为基因组。取少量扩增产物进行琼脂糖电泳检测，扩增特异条带单一。

### 4) 线性化克隆载体和插入片段扩增产物浓度测定

将线性化克隆载体和插入片段扩增产物做数个等体积稀释梯度，原始产物和稀释后产物各取1  $\mu$ l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，图四)。由图可知，pUC19酶切产物DNA浓度约为100 ng/ $\mu$ l；扩增产物DNA浓度约为400 ng/ $\mu$ l。



M: DNA Marker III。上样5  $\mu$ l，除1.2 kb条带为100 ng以外，其余条带DNA量均为50 ng。可见，pUC19酶切产物稀释一倍后上样1  $\mu$ l，条带亮度与相近大小Marker条带3.0 kb亮度相似(图中橙色框标记)，因此pUC19酶切产物DNA浓度约为 $50 \text{ ng} \times 2 = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 。扩增产物稀释七倍后上样1  $\mu$ l，条带亮度与相近大小Marker条带0.5 kb亮度相似(图中绿色框标记)，因此扩增产物DNA浓度约为 $50 \text{ ng} \times 8 = 400 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 。

图四：线性化克隆载体和插入片段PCR产物琼脂糖电泳浓度测定

### 5) 反应体系配制及反应

根据4.5进行重组反应章节中计算公式，计算重组反应所需DNA量：

pUC19线性化克隆载体最适使用量：0.02×2700 (2700 bp) ≈ 50 ng

插入片段PCR产物最适使用量：0.04×500 (500 bp) ≈ 20 ng

为了方便体系配制时准确吸取，将pUC19酶切产物用ddH<sub>2</sub>O稀释至50 ng/μl；扩增产物用ddH<sub>2</sub>O稀释至20 ng/μl。于冰水浴中配制以下反应体系：

	重组反应	阴性对照*
ddH <sub>2</sub> O	12 μl	18 μl
pUC19酶切产物 (≈50 ng/μl)	1 μl	1 μl
500bp 插入片段扩增产物 (≈20 ng/μl)	1 μl	1 μl
5×CE II Buffer	4 μl	0 μl
Exnase® II	2 μl	0 μl
Total	20 μl	20 μl

\*阴性对照反应可用来确认线性化克隆载体和插入片段扩增产物中有无环状质粒残留。推荐进行。

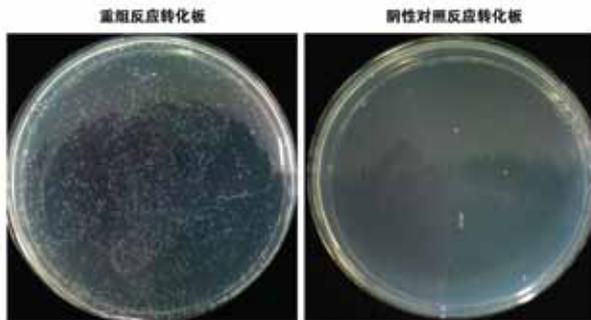
使用移液器上下吹打数次，轻轻混匀各组分。置于37℃反应30 min。反应完成后立即将反应管置于冰水浴中，冷却5 min。

### 6) 重组产物转化、涂板

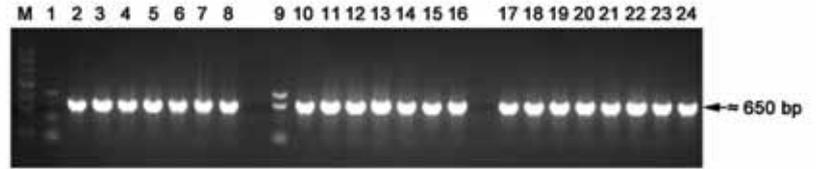
参见4.6 反应产物转化、涂板。所用感受态转化效率为10<sup>7</sup> cfu/μg。转化完成后，将培养菌液在5000 rpm离心3 min收集菌体，用100 μl LB培养基重悬后全部涂板。

### 7) 克隆鉴定

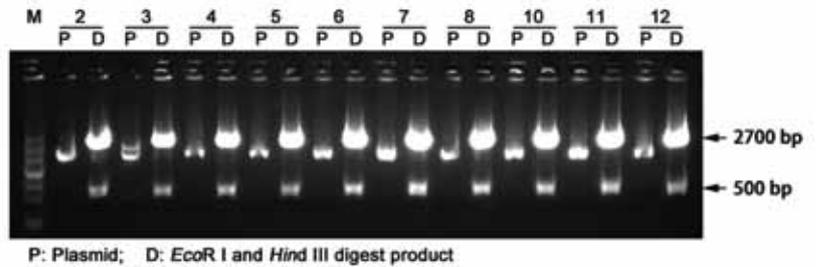
过夜培养后，重组反应转化平板上形成数百个单克隆，而阴性对照反应转化平板上的克隆数应显著少于前者(图五)。挑取重组反应转化平板上24个克隆进行菌落PCR鉴定(Taq Master Mix, Vazyme, P112)，鉴定引物使用测序引物M13F, RV-M。如果克隆正确，应有约650 bp PCR条带出现。经鉴定所挑24个克隆中有22个克隆(除1#和9#外)确认为阳性克隆(图六)。挑取其中10个克隆提取质粒后经 EcoR I 和Hind III 双酶切鉴定确认，全部为阳性(图七)。



图五：转化后过夜培养的平板



图六：菌落PCR琼脂糖电泳



图七：酶切产物琼脂糖电泳

M: Marker III; 2 - 8, 10 - 12, 10个单克隆。

## 6/注意事项

下表列出了使用ClonExpress® II进行重组克隆时主要注意事项(表三)：

实验步骤	推荐这样做	不应该这样做
载体克隆位点选择	尽量选择无重复序列，且GC含量比较均匀的区域进行克隆。当克隆位点上下游20 bp区域内GC含量均在40%~60%范围之内时，克隆效率将达到最大	选择带有重复序列，或高GC、高AT区域的区域进行克隆
插入片段引物设计	按照图二所示进行设计	载体末端同源序列少于推荐长度或者添加序列与线性化克隆载体末端序列不完全一致
克隆载体线性化	完全线性化，无环状质粒残留	不完全线性化，有环状质粒残留
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
线性化载体/插入片段扩增产物DNA纯化	在进行较大片段(>5kb)克隆时，使用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(>5kb)克隆、使用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
线性化载体/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量以及比例配制	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℃反应30 min	反应温度偏离37℃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℃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℃长时间储存后进行转化
菌落PCR	使用至少一条载体通用引物进行扩增鉴定	使用两条基因特异性引物进行扩增鉴定

表三：使用ClonExpress® II 进行重组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/ $\mu$ 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). 线性化克隆载体和插入片段扩增产物的使用量不足/过量, 或者比例不佳:

尽量按照推荐的量和比例配制反应体系。在进行重组克隆时, 如克隆载体使用量低于0.01 pmol, 或者克隆载体与插入片段摩尔比超出2:1~1:5的范围时都会严重降低克隆效率。所以, 反应体系应尽量按照最适DNA需求量进行配制。请务必预先检测线性化克隆载体和插入片段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). 载体和插入片段不纯, 抑制反应:

未纯化DNA加入重组反应体系内的总体积不应超过4  $\mu$ l (反应体系体积1/5)。尝试对线性化载体、PCR产物进行胶回收纯化。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ddH<sub>2</sub>O中保存(常规胶回收试剂盒中的洗脱液可用pH8.0的ddH<sub>2</sub>O替代), 请勿使用TE进行DNA保存。

### 2 多数克隆不含插入片段

#### a). 克隆载体线性化不完全:

即使是痕量未完全酶切的载体也会产生很高的转化背景。提高限制性内切酶使用量、延长酶切反应时间、胶回收纯化酶切产物, 都可以有效减少甚至消除环状质粒残留。

#### b). 反应体系中混入了相同抗性的质粒:

PCR扩增模板(扩增克隆载体或者扩增插入片段)为环状质粒。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, 都可以有效减少甚至消除环状模板质粒残留。

### 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或扩增制备, 而是由已插入其他不同片段的载体酶切或扩增制备而成, 不完全酶切或残留环状模板质粒将导致很高的转化背景, 使部分克隆中含有不正确的插入片段。提高酶切效率、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, 都可以有效避免此类情况发生。

### 4 特别提醒!

在选择克隆位点时, 应避免选择克隆位点上下游50 bp内有重复序列的区域。当克隆位点上下游20 bp区域内GC含量均在40%~60%范围之内时, 重组效率将达到最大。如这部分区域GC含量高于70%或者低于30%, 重组效率会受到较大影响。