

# ClonExpress<sup>®</sup> MultiS

## 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® MultiS是新一代的重组克隆试剂盒，该试剂盒中包含有专门针对多片段重组反应而优化的反应缓冲液和重组酶Exnase® MultiS。使用该试剂盒，可以一次实现多至五个插入片段的顺序拼接克隆。此外，Exnase® MultiS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
- 可一次实现多至五个插入片段的顺序拼接克隆
- 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

- 多片段拼接克隆
- 全基因合成
- DNA定点突变

## 2/产品组成

组 分	C113-01 (10 rxn)	C113-02 (25 rxn)
5 × CE MultiS Buffer	40 µl	100 µl
Exnase® MultiS	20 µl	50 µl
pUC19 control vector, linearized (50 ng/µl)	5 µl	5 µl
Control insert Mix (0.5 kb, 10 ng/µl; 1 kb, 20 ng/µl; 2 kb, 40 ng/µl)	5 µl	5 µl

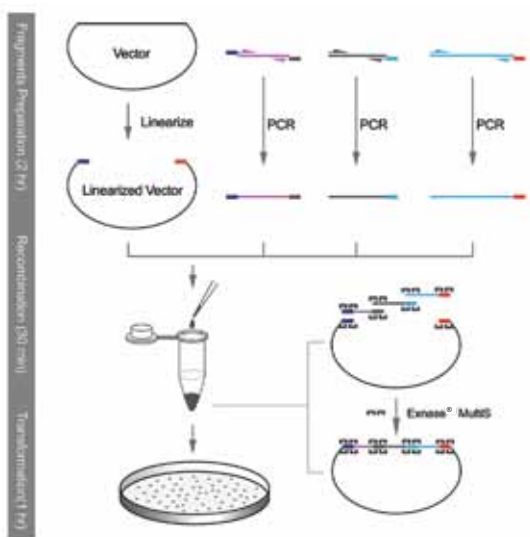
### 3/贮藏与保质期

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).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® MultiS进行多片段拼接克隆实验流程

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，左上)。插入片段由PCR扩增制备。所用扩增引物在设计时需在其5'端添加同源重组序列(图中以深蓝色、深灰色、浅蓝色和红色标记)。使用这些引物分别扩增插入片段，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同源重组的一致序列(图，右上)。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℃反应30 min即可完成重组反应，实现多片段顺序拼接并克隆至目标载体(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® MultiS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® MultiS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℃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® MultiS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	环状质粒	DpnI 消化后直接使用 (降解扩增模板)	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® MultiS引物设计总的原则是：通过在引物5'端引入同源重组序列，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同源重组的完全一致的序列(15 bp~20 bp)。以pUC18作为克隆载体为例、进行三插入片段顺序拼接克隆(5'至3'按克隆顺序依次为：第一片段、第二片段、第三片段)为例，引物具体设计方案如下：

首先设计第一片段的正向扩增引物和第三片段的反向扩增引物(与载体相邻的两个插入片段), 如图二所示

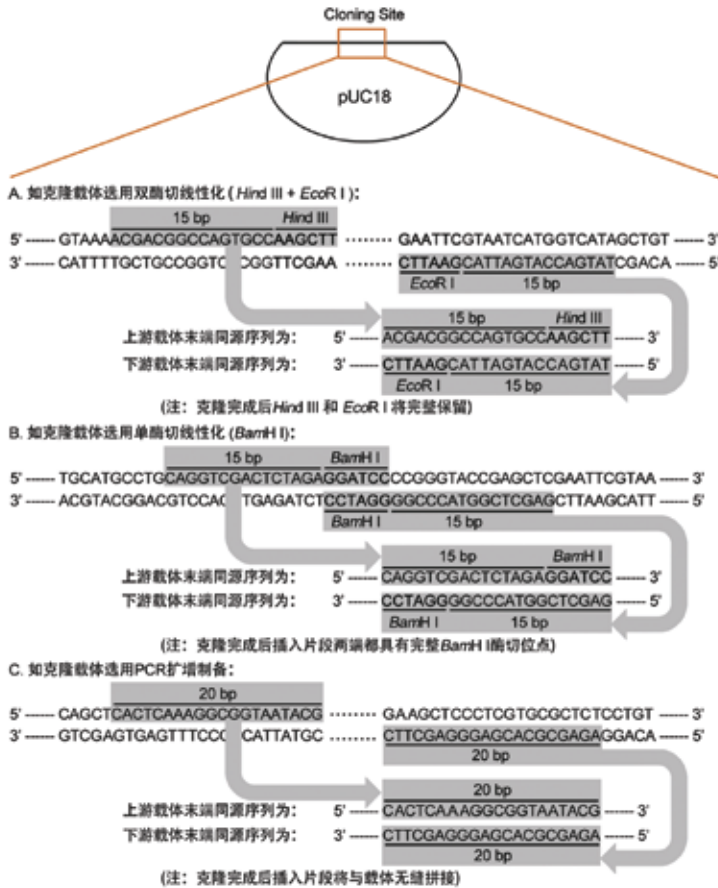
插入片段正向扩增引物设计方式为:

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: 第一片段的正向扩增引物和第三片段的反向扩增引物设计示意

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。

其次设计第一片段的反向扩增引物和第二片段的正向扩增引物。用于片段之间进行重组的同源序列可以添加至前方片段的反向扩增引物中, 也可以添加至后方片段的正向扩增引物中, 还可以两片各添加一部分。以将同源序列添加至前方片段(第一片段)的反向扩增引物中为例, 引物具体设计方案如图三所示:

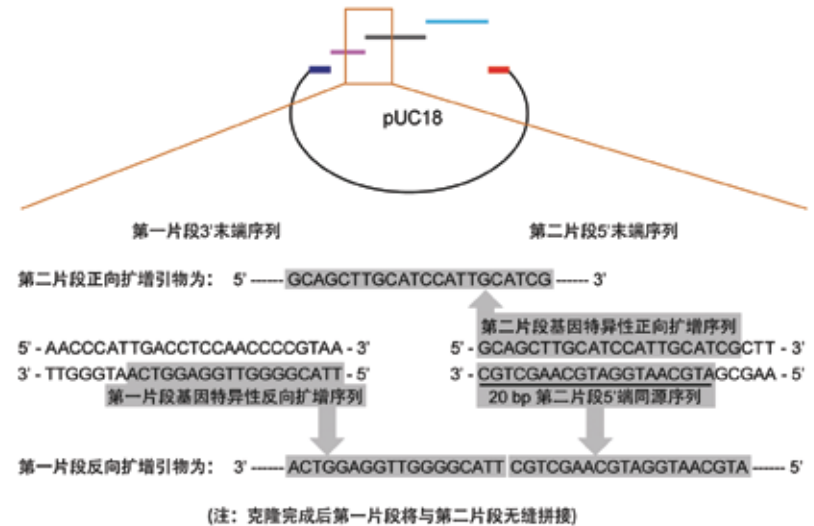
第一片段反向扩增引物设计方式为:

3' —— 第一片段基因特异性反向扩增序列 + 第二片段5'端同源序列 —— 5'

第二片段正向扩增引物设计方式为:

5' —— 第二片段基因特异性正向扩增序列 —— 3'

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; 第二片段5'端同源序列即用于第一片段与第二片段进行重组的添加序列。设计方案如下:



图三: 第一片段的反向扩增引物和第二片段的正向扩增引物设计示意

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。

最后设计第二片段的反向扩增引物和第三片段的正向扩增引物。设计与第一片段的反向扩增引物和第二片段的正向扩增引物设计方式一致。具体方案参见图三。

#### 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® MultiS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	Dpnl 消化后直接使用*	胶回收或Dpnl 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Dpnl消化结束后应置于85°C加热20min失活Dpnl 活性，以避免重组反应时残留Dpnl 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 MultiS Buffer	4 μl
线性化克隆载体	x ng
插入片段扩增产物	x ng
Exnase® MultiS	2 μl

ClonExpress® MultiS重组反应体系最适DNA使用量为每片段(包括线性化克隆载体) 0.03 pmol。该摩尔数对应的DNA质量可由以下公式粗略计算获得：

$$\text{每片段最适使用量} = [0.02 \times \text{片段碱基对数}] \text{ ng (0.03 pmol)}$$

例如，将长度为0.5 kb、1 kb、2 kb三插入片段克隆至长度为5 kb的克隆载体时，各片段最适使用量为：

$$\text{线性化克隆载体最适使用量: } 0.02 \times 5000 = 100 \text{ ng}$$

$$0.5 \text{ kb插入片段最适使用量: } 0.02 \times 500 = 10 \text{ ng}$$

$$1 \text{ kb插入片段最适使用量: } 0.02 \times 1000 = 20 \text{ ng}$$

$$2 \text{ kb插入片段最适使用量: } 0.02 \times 2000 = 40 \text{ ng}$$

- 注意：1. 线性化克隆载体的使用量应在50~200 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。  
2. 插入片段DNA使用量应大于10 ng。当使用上述公式计算DNA最适使用量低于这个值时，直接使用10 ng即可。  
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 μl。

ClonExpress® MultiS 试剂盒中提供pUC19 control vector, linearized (50 ng/μl)和Control insert Mix (0.5 kb, 10 ng/μl; 1 kb, 20 ng/μl; 2 kb, 40 ng/μl)各5 μl，需要时可进行阳性对照反应，每次反应各加1 μl。

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 μl冷却反应液，加入到200 μl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 μl SOC或LB培养基，37°C孵育10 min充分复苏。37°C摇菌45 min。取100 μl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<sup>8</sup> cfu/μg的感受态细胞。如果感受态转化效率<10<sup>8</sup> cfu/μg (例如用CaCl<sub>2</sub>法新鲜制备的感受态转化效率通常在10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> cfu/μg之间)，请将培养菌液在5000 rpm离心3 min收集菌体，用100 μl LB培养基重悬后全部涂板。

#### 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 μl LB培养基中混匀，直接取1 μl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。

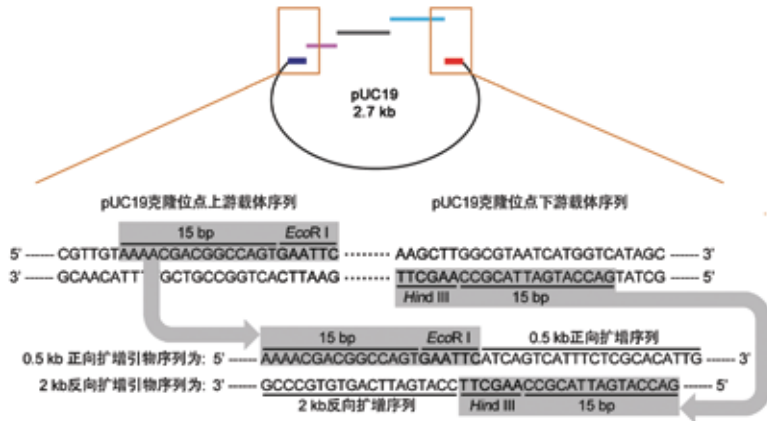
## 5/参考实例(对照反应)

实验目标：在pUC19载体的EcoR I 和Hind III 酶切位点间插入三段基因，长度分别为0.5 kb, 1 kb和2 kb。0.5 kb片段靠近EcoR I酶切位点，2 kb片段靠近Hind III酶切位点。

#### 1) 插入片段引物设计

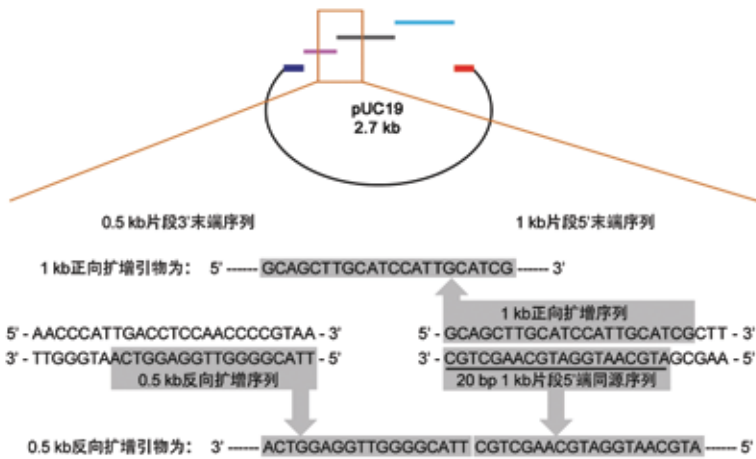
根据图二双酶切引物设计方案，设计0.5 kb正向扩增引物和2 kb反向扩增引物如下 (图四)：





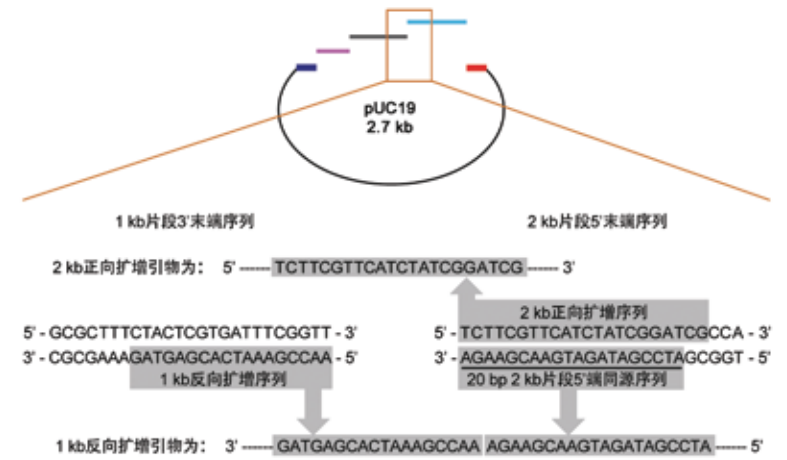
图四：0.5 kb正向扩增引物和2 kb反向扩增引物设计

根据图三引物设计方案，设计0.5 kb反向扩增引物和1 kb正向扩增引物如下(图五)：



图五：0.5 kb反向扩增引物和1 kb正向扩增引物设计

根据图三引物设计方案，设计1 kb反向扩增引物和2 kb正向扩增引物如下(图六)：



图六：1 kb反向扩增引物和2 kb正向扩增引物设计

## 2) 克隆载体线性化

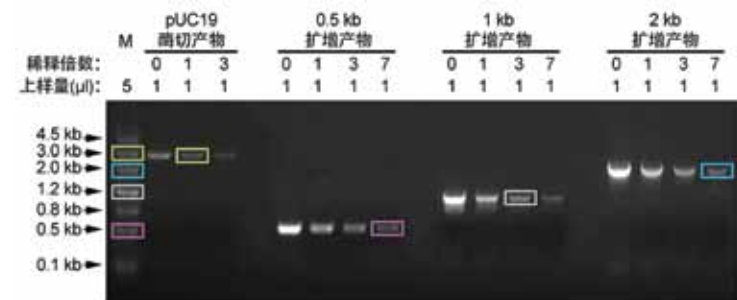
将2 μg环状pUC19质粒加入到20 μl酶切反应体系中，37℃酶切2 hr。内切酶使用量为EcoR I和Hind III各1μl。酶切完成后，将酶切产物置于65℃加热20 min，失活内切酶。

## 3) 插入片段PCR扩增

使用Phanta™ Super-Fidelity DNA Polymerase(Vazyme, P501)对三插入片段进行扩增，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 μl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，图七)。由图可知，pUC19酶切产物DNA浓度约为100 ng/μl；扩增产物DNA浓度都约为400 ng/μl。



图七：线性化克隆载体和插入片段PCR产物琼脂糖电泳浓度测定

M: DNA Marker III。上样5  $\mu\text{l}$ ，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  $\mu\text{l}$ ，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  $50 \text{ ng} \times 2 = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ；0.5 kb扩增产物稀释七倍后上样1  $\mu\text{l}$ ，条带亮度与相近大小Marker条带0.5 kb亮度相似(图中紫色框标记)，因此浓度约为  $50 \text{ ng} \times 8 = 400 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ；1 kb扩增产物稀释三倍后上样1  $\mu\text{l}$ ，条带亮度与相近大小Marker条带1.2 kb亮度相似(图中灰色框标记)，因此浓度约为  $100 \text{ ng} \times 4 = 400 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ；2 kb扩增产物稀释七倍后上样1  $\mu\text{l}$ ，条带亮度与相近大小Marker条带2.0 kb亮度相似(图中蓝色框标记)，因此浓度约为  $50 \text{ ng} \times 8 = 400 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 。

#### 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： $0.02 \times 2700$  (2700 bp)  $\approx 50 \text{ ng}$

0.5 kb插入片段PCR产物最适使用量： $0.02 \times 500$  (500 bp)  $\approx 10 \text{ ng}$

1 kb插入片段PCR产物最适使用量： $0.02 \times 1000$  (1000 bp)  $\approx 20 \text{ ng}$

2 kb插入片段PCR产物最适使用量： $0.02 \times 2000$  (2000 bp)  $\approx 40 \text{ ng}$

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/ $\mu\text{l}$ ；扩增产物用ddH<sub>2</sub>O分别稀释至：0.5 kb插入片段10 ng/ $\mu\text{l}$ ，1 kb插入片段20 ng/ $\mu\text{l}$ ，2 kb插入片段40 ng/ $\mu\text{l}$ 。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	10 $\mu\text{l}$	16 $\mu\text{l}$
pUC19酶切产物 ( $\approx 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
0.5 kb 插入片段扩增产物 ( $\approx 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
1 kb 插入片段扩增产物 ( $\approx 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
2 kb 插入片段扩增产物 ( $\approx 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
5 $\times$ CE MultiS Buffer	4 $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$
Exnase <sup>®</sup> MultiS	2 $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$
Total	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$

\*阴性对照反应可用于确认线性化克隆载体和插入片段扩增产物中是否有环状质粒残留。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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

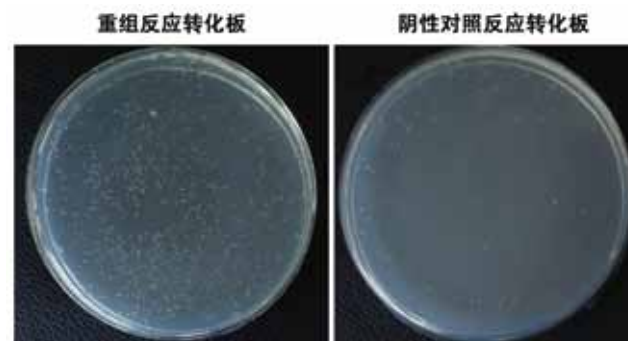
#### 6) 重组产物转化、涂板

参见4.6 反应产物转化、涂板。所用感受态转化效率为 $10^7 \text{ cfu}/\mu\text{g}$ 。转化完成后，将培养菌液在5000 rpm离心3 min收集菌体，用100  $\mu\text{l}$  LB培养基重悬后全部涂板。

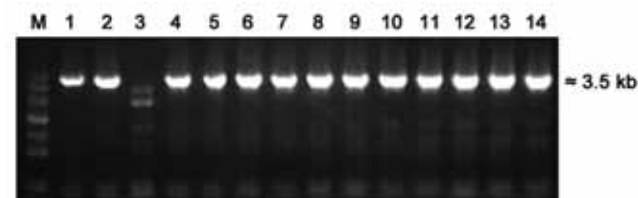
#### 7) 克隆鉴定

过夜培养后，重组反应转化平板上形成上百个单克隆，而阴性对照反应转化平板上的克隆数应显著少于前者(图八)。挑取重组反应转化平板上14个克隆进行菌落PCR鉴定(Taq Plus Master Mix, Vazyme, P212)，鉴定引物使用测序引物M13F, RV-M。如果克隆正确，应有约3.5 kb PCR条带出现。经鉴定所挑14个克隆中有13个克

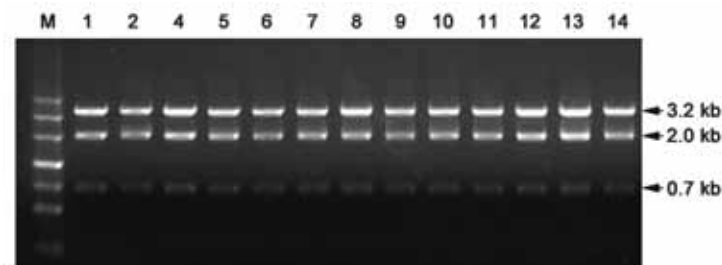
隆(除3#外)确认为阳性克隆(图九)。全部挑取提取质粒后经EcoR I和BamHI双酶切鉴定确认，全部为阳性(图十)。



图八：转化后过夜培养的平板



图九：菌落PCR琼脂糖电泳  
M: Marker III; 1-14, 14个单克隆。



图十：酶切产物琼脂糖电泳  
M: Marker III; 1-2, 4-14, 13个单克隆。

## 6/注意事项

下表列出了使用ClonExpress® MultiS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	按照图二/三所示进行设计	同源序列少于推荐长度或者添加错误
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(插入片段总长>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(插入片段总长>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°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® MultiS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用量不足/过量,或者比例不佳:尽量按照推荐的量配制反应体系。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。

- 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。将重组反应产物稀释5倍后取1/5进行转化。

### 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背景。提高限制性内切酶用量、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20bp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。