

# 2 × CloneUFO<sup>®</sup> One Step Cloning Mix

## 2 × CloneUFO<sup>®</sup>重组克隆预混液

C121

Version 23.1.1



产品说明书  
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司  
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

## 目录 Product Manual

产品简介 .....	1
产品特点 .....	1
产品应用 .....	1
储存条件 .....	1
产品组成 .....	2
实验流程图 .....	2
实验方案 .....	3
注意事项 .....	8

## 产品简介

### CloneUFO® One Step Cloning 一步重组酶克隆技术

CloneUFO® One Step Cloning 技术是一种快速 Fast、高效 Efficient、简便 Easy 的 DNA 定向克隆技术，可将目的基因的 PCR 产物定向克隆至任意载体的任意位点。2 × CloneUFO® One Step Cloning Mix 是 T4 噬菌体某基因进行异源表达获得的重组酶为核心的全新一代重组克隆预混液，其中将重组反应所需缓冲液和重组酶 UvsXase 合为一管。UvsXase 能够兼容常规酶切、PCR 反应体系。克隆载体酶切产物或 PCR 产物和目的基因 PCR 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。

基本步骤：将载体在克隆位点进行全质粒扩增，得到线性化载体；设计同源引物，使得目的片段 PCR 产物的 5' 和 3' 末端分别带有和预插入的线性化载体前后两末端完全一致的序列 (15 bp ~ 20 bp)；将扩增好的目的基因 PCR 产物和线性化载体按一定比例混合后，在 UvsXase 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。

## 产品特点

- 简单、快速、高效
- 适用于向几乎任何载体的任何位点进行定向克隆
- 无需考虑载体和目的基因片段上的酶切位点
- 可高效克隆 50 bp ~ 10 kb 片段
- 线性化载体和 PCR 产物可不进行纯化直接克隆
- 不依赖于连接酶及磷酸酶，克隆阳性率可达 95% 以上

## 产品应用

- 快速克隆
- 无缝克隆
- 高通量克隆
- DNA 定点突变

## 储存条件

-20℃ 保存，于 -20 ~ 0℃ 运输。▲避免反复冻融。

## 产品组成

组分	C121 (25 rxns)	C121 (50 rxns)
2 × CloneUFO® One Step Cloning Mix	250 μl	500 μl
ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml

## 实验流程图

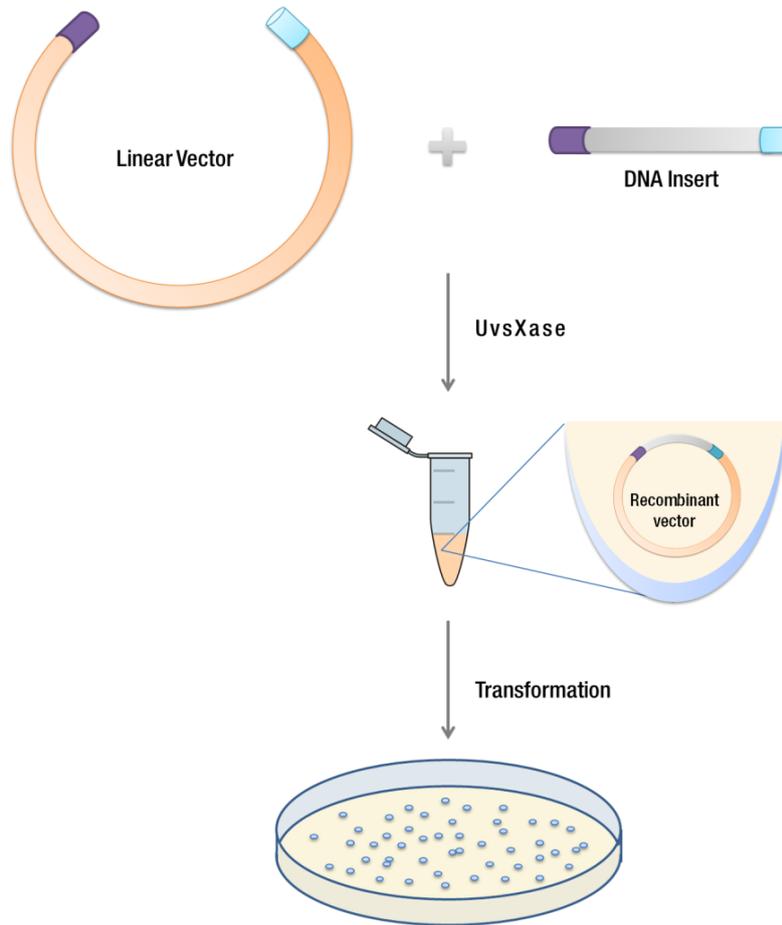
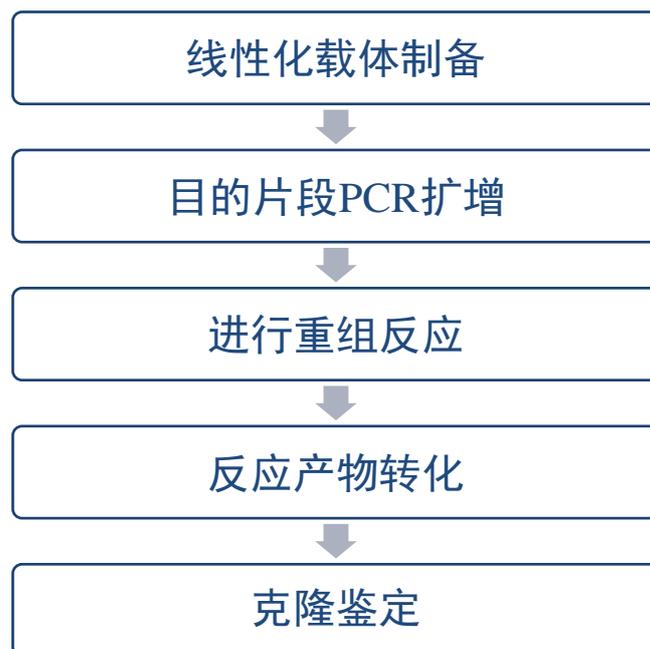


Fig. 1 使用 2 × CloneUFO® One Step Cloning Mix 进行单基因克隆实验流程图

## 实验方案



### 1. 制备线性化载体:

选择合适的目的基因插入区域，对载体进行线性化。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。当载体上目的基因插入区域上下游 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。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。

#### (1) 酶切制备线性化载体

我们推荐使用双酶切对载体进行线性化，线性化完全，转化背景（假阳性克隆）低。载体酶切结束，将酶切产物加热失活内切酶（灭活温度参见各种内切酶说明书，例如 HindIII，65℃ 加热 20 min 完全失活）后可直接用于重组反应。



为了防止重组产物转化后出现的假阳性克隆（无目的基因片段，由环状载体模板转化而来），我们建议您对载体进行充分的双酶切后胶回收处理以获得线性化载体。

## (2) 反向 PCR 扩增制备线性化载体

(a) 使用 2 × Proofast<sup>®</sup> Max Master Mix 高保真聚合酶对载体进行反向 PCR 扩增，以获得线性化载体扩增产物；

### 反应体系配制：

组分	用量
ddH <sub>2</sub> O	to 50 μl
2×Proofast <sup>®</sup> Max Master Mix	25 μl
模板DNA	optional
引物1 (10 μM)	2 μl
引物2 (10 μM)	2 μl

### 一般 PCR 反应条件设置：

步骤	温度	时间	阶段	循环数
预变性	95°C	30 sec ~ 3 min	Stage 1	Rep: 1
变性	95°C	5 ~ 10 sec		
退火	45°C ~ 72°C	10 ~ 30 sec	Stage 2	Reps: 25 ~ 35
延伸	72°C	15 ~ 30 sec/kb		
彻底延伸	72°C	5 ~ 10 min	Stage 3	Rep: 1

(b) PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳以检验扩增产量和特异性，同时对比亮度测得目的条带浓度；

我们一般推荐用电泳比较条带亮度的方法测定 DNA 浓度，用 Nanodrop 等基于吸光值的仪器进行浓度测定，只有当 A260/A280 在 1.8 ~ 2.0 之间时浓度值可信。

(c) 胶回收或者 DpnI 消化去除环状质粒模板；

若经琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物电泳条带单一，扩增产物经 DpnI (2 U/50 μl 扩增产物) 消化后，直接用于重组反应；若经琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物电泳条带明显不单一，需经胶回收纯化后再进行重组反应。

(d) 若经胶回收处理，测定 DNA 浓度即可直接用于重组反应；若经 DpnI 消化，消化结束后应置于 85°C 加热 20 min 将 DpnI 失活后再用于重组反应；

(e) 进行重组反应。



不同方式制备的线性化载体的使用方式可查阅表一：

Table 1 线性化载体的使用方式

载体线性化方式	模板类型	快速实验方案	最佳实验方案
酶切制备	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	扩增产物条带单一	DpnI 消化模板后直接使用 胶回收或 DpnI 消化后胶回收
		扩增产物条带明显不单一	胶回收

直接使用扩增产物进行重组反应时，加样体积不应超过重组反应总体积的 1/5；

## 2. 目的片段 PCR 扩增

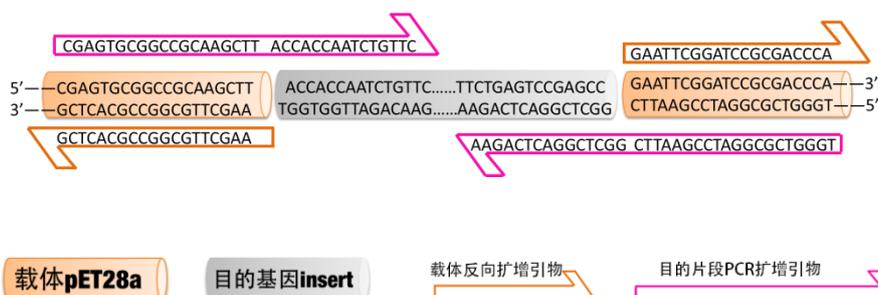
### (1) 目的片段 PCR 扩增引物设计

2 × CloneUFO® One Step Cloning Mix 引物设计总的原则是：在引物的 5' 端引入预插入线性化载体末端同源序列，使得目的基因 PCR 扩增产物的 5' 和 3' 最末端分别带有和线性化载体两末端对应的完全一致的序列 (15 bp ~ 20 bp)。以 pET28a 作为载体为例，引物设计方案如下图所示。

#### (a) 载体选用双酶切线性化 (HindIII/EcoRI)：



#### (b) 载体选用反向 PCR 线性化：



注：计算目的片段 PCR 扩增引物退火温度时，与载体末端同源序列不参与计算 T<sub>m</sub> 值，只需计算参与目的基因扩增的序列。

## (2) 目的片段 PCR 扩增

(a) 使用  $2 \times$  Proofast<sup>®</sup> Max Master Mix 高保真聚合酶对目的片段进行 PCR 扩增；

(b) PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳以检验扩增产量和特异性，同时对比亮度测得目的条带浓度；

我们一般推荐用电泳比较条带亮度的方法测定 DNA 浓度，用 Nanodrop 等基于吸光值的仪器进行浓度测定，只有当 A260/A280 在 1.8 ~ 2.0 之间时浓度值可信。

(c) 胶回收或者 DpnI 消化去除与预插入载体抗性相同的环状质粒模板；

若经琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物电泳条带单一，扩增产物经 DpnI 消化后，直接用于重组反应；若经琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物电泳条带明显不单一，需经胶回收纯化后再进行重组反应。如果扩增目的片段的 PCR 模板是与预插入载体抗性不同的环状质粒，或是基因组、cDNA，无需进行该步骤。

(d) 若经胶回收处理，测定 DNA 浓度即可直接用于重组反应；若经 DpnI 消化，消化结束后应置于 85°C 加热 20 min 将 DpnI 失活后再用于重组反应。

(e) 进行重组反应。

目的片段 PCR 扩增产物的使用方式可查阅表二：

Table 2 扩增产物推荐使用方式

PCR 扩增情况	PCR 模板类型	快速实验方案	最佳实验方案
扩增产物条带单一	与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
	与载体抗性不同的环状质粒、基因组、cDNA	直接使用	胶回收
扩增产物条带明显不单一		胶回收	

直接使用扩增产物进行重组反应时，加样体积不应超过重组反应总体积的 1/5。

## 3. 进行重组反应

### (1) 最适载体与片段添加量计算：

$2 \times$  Proofast<sup>®</sup> Max Master Mix 重组反应体系最适载体使用量为 0.03 pmol；最适插入片段使用量为 0.06 pmol (载体与插入片段摩尔比为 1: 2)。这些摩尔数对应的 DNA 质量可由以下公式计算获得：

$$0.03 \text{ pmol 对应载体使用量} = (0.03 \times 0.325 \times 2 \times \text{载体碱基对数}) \text{ ng}$$

$$0.06 \text{ pmol 对应片段使用量} = (0.06 \times 0.325 \times 2 \times \text{片段碱基对数}) \text{ ng}$$

例如，将长度为 2 kb 的目的片段克隆至长度为 6 kb 的载体时，载体的最适使用量应为： $0.03 \times 0.325 \times 2 \times 6000 = 117 \text{ ng}$ ；目的片段最适使用量应为： $0.06 \times 0.325 \times 2 \times 2000 = 78 \text{ ng}$ 。

其式中 325 为四种核苷酸的分子量平均值；2 表示双链。

注意：

1. 当目的片段长度大于载体时，最适载体与片段使用量的计算方式应互换，即将片段当做载体、载体当做片段进行计算。
2. 线性化载体的使用量应在 50 ~ 200 ng 之间；插入片段扩增产物的使用量应在 20 ~ 200 ng 之间。当计算获得的 DNA 最适使用量超出这个范围时，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，实际反应体系中应添加目的片段扩增产物最少使用量 20 ng。
3. 线性化载体和目的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 1/5，20  $\mu$ l 体系即 4  $\mu$ l。

## (2) 于冰水浴中配制如下反应体系：

组分	用量
ddH <sub>2</sub> O	to 20 $\mu$ l
2 $\times$ CloneUFO <sup>®</sup> One Step Cloning Mix	10 $\mu$ l
线性化载体	50 ~ 200 ng
扩增片段	20 ~ 200 ng

如果不慎将液体粘在管壁，可通过短暂离心使其沉入管底。

## (3) 重组反应

体系配制完成后，用移液器轻轻吹打，混匀各组分。置于 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C，待需要时解冻转化。

## 4. 反应产物转化

- (1) 在冰上解冻克隆感受态细胞（如：DH5 $\alpha$ 、BL21、TOP10）。
- (2) 取 10  $\mu$ l 重组产物加入到 100  $\mu$ l 感受态细胞中，枪头轻轻旋转 5 圈混匀，冰上静置 30 min。
- (3) 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 90 sec，立即置于冰水上冷却 2 ~ 3 min。
- (4) 加入 800  $\mu$ l SOC 或 LB 培养基（不添加抗生素），37 $^{\circ}$ C，200 rpm 孵育 1 h。
- (5) 4,000 rpm 离心 5 min，弃掉 800  $\mu$ l 上清。用剩余培养基重悬菌体后全部涂板，平板正放 5 min 固定涂布菌液。
- (6) 37 $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养 12 ~ 16 h。

## 5. 克隆鉴定

### (1) 菌落 PCR

用无菌的枪头或牙签挑取 10 个左右单个菌落分别至 20 ~ 50  $\mu$ l LB 培养基 EP 管中混匀，直接取 1  $\mu$ l 作为 PCR 模板。我们推荐您使用的引物：一条来自用于扩增目的基因片段的引物，一条来自通用测序引物，进行菌落 PCR 扩出含有目的片段的那部分，这样可以避免 PCR 假阳性的产生。

### (2) 测序

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。

## 注意事项

### 1. 平板上长不出克隆或克隆数目很少

#### (1) 引物设计不正确：

引物包含 15 bp ~ 20 bp 同源序列，GC 含量 40% ~ 60%。

#### (2) 感受态效率低：

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。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。

#### (3) 线性化载体和目的片段扩增产物的使用量不足/过量，或者比例不佳：

尽量按照推荐的使用量和比例配制反应体系。

#### (4) 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反应体系体积 1/5。建议对线性化载体、PCR 产物进行胶回收纯化，同时推荐您将常规胶回收试剂盒中的洗脱液 Elution Buffer 可用 pH8.0 的 ddH<sub>2</sub>O 替代。

#### (5) 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。

### 2. 多数克隆不含插入片段或含有不正确的片段

#### (1) PCR 产物混有非特异扩增产物：

优化 PCR 体系，提高特异性 ( $T_m$  计算不包括同源序列)；胶回收 PCR 产物；鉴定更多的克隆。

#### (2) 载体线性化不完全：

可通过阴性对照检测载体是否线性化完全，优化酶切体系，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、DpnI 消化去除模板。

#### (3) 反应体系中混入了相同抗性的质粒：

PCR 扩增模板为环状质粒时，如扩增产物未纯化直接用于重组反应时推荐 Dpn I 消化，或者对扩增产物进行胶回收纯化。



025-85653525

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

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室