

## 2×重组克隆 Mix 2.0

使用前请仔细阅读说明书

保存：-20℃保存一年

本重组克隆是一种高效快速的 DNA 定向克隆技术。该试剂盒可以在线性化的载体中插入两个或者多个目的 DNA 片段，目的片段两端只需要与线性化载体 5' 和 3' 末端有 15-20 bp 的同源序列（插入多片段即需要相邻片段尾首端有 15-20 bp 的同源序列），PCR 产物和载体按照一定比例混合，在重组酶的作用下，50℃反应 15-30 min 即可实现 2-5 个片段的重组插入，克隆阳性率高。

2×重组克隆 Mix 2.0 是在 2×重组克隆 Mix 1.0 的基础上进行优化的重组克隆试剂盒，适用于 ≥2 个片段的重组克隆，阳性率高，操作步骤简单。

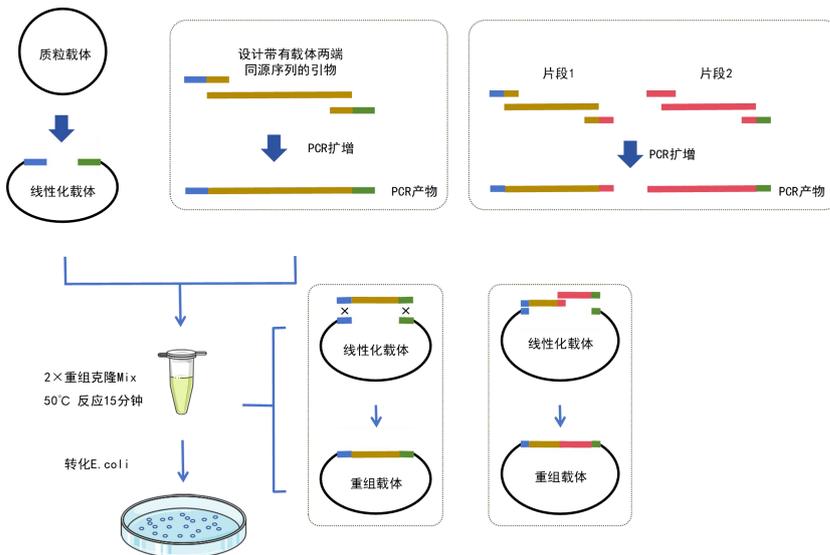


图 1.重组克隆原理图

1. 载体线性化（酶切或 PCR 的方式获得）；
2. 通过 PCR 方式获得目的片段；
3. 插入片段和载体混合进行重组反应；
4. 转化获得重组克隆并进行阳性克隆筛选。

### 产品组成

组分名称	ASC-01	ASC-02
2×重组克隆 Mix 2.0	200 μL	500 μL

### 操作步骤

#### 1、线性化载体和目的片段制备：

##### （1）线性化载体制备

使用限制性内切酶酶切质粒得到线性载体，需要尽量酶切完全然后切胶回收；



使用 PCR 扩增线性载体，以质粒为模板扩增的 PCR 产物应使用 **Dpn I** 消化后再纯化或胶回收。（推荐使用本公司 2×Pfu PCR Mix 制备线性载体）

## （2）目的片段制备

设计目的片段的 PCR 引物：插入片段扩增引物由两部分构成——重叠区域 + 特异性引物，即在插入片段的正/反向引物的 5' 端引入线性化载体两末端同源序列 15~20 bp（不包括酶切位点），使得扩增后的插入片段 5' 和 3' 端带有和线性化载体末端一致的同源序列。

### 引物设计方式如下：

正向引物（5' -3'）：

上游载体末端同源序列（15~25 bp）+ 酶切位点（可选）+ 正向特异性引物扩增序列

反向引物（5' -3'）：

下游载体末端同源序列（15~25 bp）+ 酶切位点（可选）+ 反向特异性引物扩增序列

### 引物设计注意事项：

- ①基因特异性正/反向扩增引物序列， $T_m$  值 60~65℃为宜；
- ②上/下游载体末端同源臂序列，GC 含量 40% - 60%，尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域进行克隆；
- ③根据自身需要保留或删除酶切位点；
- ④计算退火温度  $T_m$  值时，只计算基因特异性扩增序列的  $T_m$  值，引入的同源序列和酶切位点无需计算。

### 2、重组反应以及转化（推荐用量）：

线性载体	载体 20-50 ng
目的片段	插入目的片段与载体摩尔比为 2:1 - 5:1（比如载体 3kb，片段 1kb，载体和片段各加 30 ng）
2×重组克隆 Mix 2.0	10 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	加至总体积 20 $\mu$ L

混匀，50℃ 反应 15-30 分钟，反应结束后，将离心管置于冰上准备转化（如不能及时做转化，可以冻存在-20℃）。

### 注意事项

- 1、使用限制性内切酶酶切质粒得到线性载体时，推荐双酶切反应，减少假阳性克隆。
- 2、使用 PCR 扩增线性载体，产物使用 Dpn I 消化后，可直接纯化回收 DNA，无需 80℃ 加热失活 Dpn I 活性。
- 3、制备目的片段时，建议使用高保真聚合酶进行 PCR 扩增（推荐使用本公司 2×HG Mix PCR 制备）。



微信公众号

网址：[www.ruoyubio.com](http://www.ruoyubio.com)

邮箱：[service@ruoyubio.com](mailto:service@ruoyubio.com)

湖南若鱼生物科技有限公司

Hunan Ruoyu Biotech Co., Ltd.