

Orisience One-Step Express Cloning Kit

(一步快速克隆试剂盒)

产品信息

货号	名称	规格
ND101-25 T	Orisience One-Step Express Cloning Kit (一步快速克隆试剂盒)	25 T
ND101-50 T	Orisience One-Step Express Cloning Kit (一步快速克隆试剂盒)	50 T
ND101-100 T	Orisience One-Step Express Cloning Kit (一步快速克隆试剂盒)	100 T

产品简介

Orisience One-Step Express Cloning Kit (一步快速克隆试剂盒) 基于同源重组原理, 只需对含有 15 bp 左右同源碱基的插入片段与载体混合物进行一步处理 (37°C, 5 min), 即可转化进入 *E. coli* 感受态细胞实现高效分子克隆。本产品相较于传统酶切-连接分子克隆技术路线, 具有**高效** (阳性克隆率 95% 以上), **快速** (仅需 5 min), **操作简便** (只需一步操作), **适用范围广** (可用于 ~20 bp-10 kb 片段克隆) 等多方面优势。

储存条件

-20°C 保存。

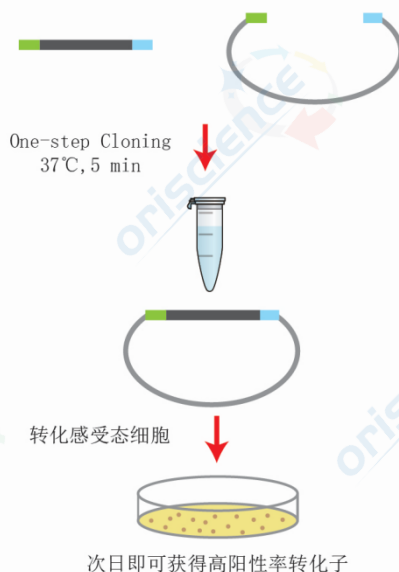
产品组成

Orisience One-Step Express Cloning Kit			
组分	ND101-25 T	ND101-50 T	ND101-100 T
5× Orisience One-step cloning mix	50 µl	100 µl	200 µl
ddH ₂ O	1 ml	2 ml	4 ml

使用说明

1. 技术路线:

PCR 扩增插入 DNA 片段 PCR 或酶切制备线性化载体



2. 线性化载体与插入片段制备：

(1) 线性化载体制备：

a. PCR 法：根据实验需要，在载体质粒上选择合适的引物结合位点，设计长度为 33 bp（15bp 末端同源序列+18bp 载体特异性序列）的一对引物，PCR 扩增载体，用于下游克隆。*OriNote*：(1) 本试剂盒反应温度为 37°C，故 15bp 末端同源序列可稳定实现重组，但引物长度亦可根据具体实验情况调整；(2) 如载体较大或不易扩增，建议在载体抗性基因编码序列内设计一对反向引物与上述引物配对扩增，此设计可降低载体一次性扩增难度，同时因只有正确重组才能重构质粒抗性，此设计可进一步提高阳性克隆率。

b. 酶切法：对载体进行酶切、胶回收以获得线性化载体。*OriNote*：(1) 酶切后形成平末端，5'端粘性末端，3'端粘性末端的载体均可使用 Orisience One-step Express Cloning Kit 进行克隆，但因末端结构不同，克隆效率略有差异；(2) 酶切不充分易造成假阳性，建议延长酶切时间。

(2) 插入片段制备：设计长度为 33 bp（与上述载体相同的 15 bp 同源序列+18 bp 插入片段特异性序列）的一对引物扩增插入片段。*OriNote*：如载体为酶切法制备，建议在插入片段扩增引物上保留完整酶切位点识别序列，即 15 bp+酶切位点识别序列+18 bp，此设计可避免插入片段出现移码，且在必要时可利用酶切位点进行阳性克隆的鉴定。

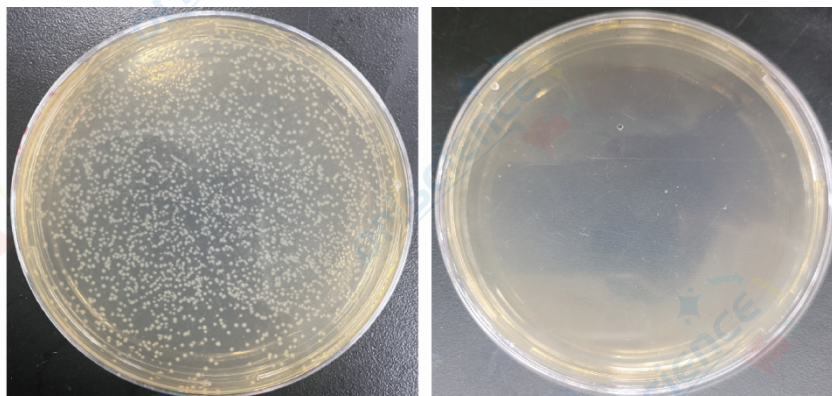
(3) 测定上述制备线性化载体和插入片段浓度。

3. 重组反应体系（推荐冰上配制，各组分使用前需混匀）

组分	体积
5× Orisience One-step cloning mix	2 μl
线性化载体	100 ng
插入片段	按载体：片段=1:2 分子比加入
ddH ₂ O	补足 10 μl
充分混匀，37°C 孵育 5 min	
转化大肠杆菌感受态细胞	

OriNote：如所制备载体浓度较低，可适当减少载体用量，此改变虽然会导致菌落数量减少，但仍可获得阳性克隆。

数据展示



Orisience One-step Express Cloning

Control(无插入片段)

注意事项

1. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。

常见问题及解决方法

Q1: 转化培养后菌落数偏少

- 载体、插入片段使用量不足或比例不佳:请按照说明书中推荐的量和比例配制反应体系。
- 载体和插入片段不纯, 抑制反应: 建议对载体、插入片段进行纯化。
- 感受态细胞转化效率低: 建议使用转化效率高的商业化感受态细胞。如感受态细胞为自制, 则需进行转化效率检测, 确保感受态细胞的状态。

Q2: 假阳性菌落占比高

- 载体酶切线性化不完全, 出现载体自连: 尽量避免单酶切, 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。
- PCR 产物含有非特异性扩增产物: 优化 PCR 体系, 提高特异性; 对 PCR 产物进行胶回收。

相关产品

名称	货号	规格
NB101-120 T	Oriscience Plasmid Mini Extraction Kit (质粒小提试剂盒)	120 T
NB401-120 T	Oriscience Gel Recovery Kit (胶回收试剂盒)	120 T
NC301-100g	Agarose (电泳级琼脂糖)	100g
NA202-1 ml	2×Oriscience Ultra-Fast HiFi Prime PCR Mix (Dye Plus) (2×高保真快速PCR预混液)	1 ml

Oriscience Biotechnology Co., Ltd.

www.oriscience.com

Tel: 400-158-2128

Emails: order@oriscience.com

technical_support@oriscience.com

