



## SmartJoin™ Target Site PCR Cloning Kit

PCR 平末端产物高效克隆试剂盒

产品货号：IC007 ( 20 次反应 )

IC008 ( 100 次反应 )

GeneCopoeia, Inc.      广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城  
掬泉路 3 号广州国际企业孵化器 F 区 8 楼

邮编：510663

电话：4006-020-200

邮箱：sales@igenebio.com

网址：www.genecopoeia.com

www.igenebio.com

## 使用手册

# SmartJoin™ Target Site PCR Cloning Kit

- I. 产品介绍
- II. 产品应用
- III. 试剂盒组份
- IV. 注意事项
- V. 操作流程
- VI. 常见问题及解决措施
- VII. 有限使用许可及质保声明

## I 产品介绍

SmartJoin™ Target Site PCR Cloning Kit 是一套 PCR 平末端产物（或其他平末端片段）的高效克隆试剂盒。试剂盒载体 **Blunt-end linear vector** 含有解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) **Barnase** 基因，其表达的小分子 RNA 酶 **Barnase** 可降解细胞中的 RNA，具有强烈的毒性，因此它在特异细胞中的表达将造成细胞的死亡。使用本套试剂盒时，连接目的片段后的重组质粒将不表达 **Barnase**，细胞可正常生长，未连接目的片段的 **Blunt-end linear vector** 自连后的质粒表达 **Barnase**，将造成细胞的死亡。因此，理论上只有胞内含有正确连接目的片段的重组质粒才能正常生长，阳性率高，无需进行蓝白斑筛选，加速了克隆筛选的实验进程，操作简单方便。

## II 产品应用

### 1. 平末端 PCR 片段的克隆

使用高保真聚合酶，如 Pfu、靶点 PCR 试剂盒（GeneCopoeia Cat#IC003）扩增后得到的平末端产物经琼脂糖凝胶电泳检测后，目的条带单一，无非特异性产物（如图 1 所示）。PCR 平末端产物可不回收纯化，直接连接本试剂盒载体 **Blunt-end linear vector** 可获得大量工程菌，阳性率高，无需进行蓝白斑筛选。若 PCR 产物有非特异性产物，建议将产物进行胶回收纯化后再进行连接及转化操作。

### 2. 其他平末端片段的克隆与测序

使用本试剂盒可对各种其他类型的平末端片段进行克隆，例如使用限制性内切酶酶切后产生的平末端产物，然后可将所得质粒作为模板进行测序。

### 3. 点突变片段的克隆与测序

对目的片段进行点突变后，推荐使用 T7 核酸内切酶 I 检测试剂盒（GeneCopoeia Cat#IC005）检测是否成功进行点突变（检测结果如图 1 所示）。使用高保真聚合酶对

点突变片段进行 PCR 扩增，并克隆到 Blunt-end linear vector 进行测序。

#### 4. IndelCheck™插入缺失检测体系

SmartJoin™ Target Site PCR Cloning Kit 是 IndelCheck™插入缺失检测体系的关键组成之一，可用于确证 CRISPR 引入的插入缺失突变。使用本试剂盒，可将靶点 PCR 产物克隆到 Blunt-end linear vector 中进行测序，用以检测靶向基因组修饰。

更多信息，请见相关网站：

[www.igenebio.com/product/indelcheck-detection-system/](http://www.igenebio.com/product/indelcheck-detection-system/)

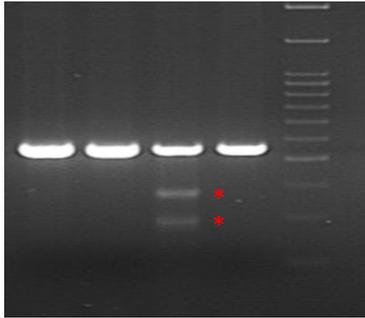


图 1. T7 核酸内切酶 I 检测结果

\* T7 核酸内切酶 I 消化的错配 PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳上显示预期的两条分子量较小的条带，表明成功进行了点突变。

### III 试剂盒组份

Target Site PCR Cloning Kits（货号：IC007；IC008）试剂盒组份如下表所示：

组分编号	组份名称 (浓度)	体积	
		20 个反应	100 个反应
IC007-01 IC008-01	5 × Ligase Buffer	40 μL	40 μL × 5
IC007-02 IC008-02	T4 DNA Ligase (200 U/μL)	20 μL	20 μL × 5
IC007-03 IC008-03	Blunt-end linear vector (20 ng/μL)	20 μL	20 μL × 5
IC007-04 IC008-04	Control Insert (40 ng/μL)	20 μL	20 μL × 5
IC007-05 IC008-05	Forward sequencing primer (20 μM)	250 μL	250 μL × 5
IC007-06 IC008-06	Reverse sequencing primer (20 μM)	250 μL	250 μL × 5

注：试剂盒保存条件：-20℃至少保存 12 个月，请注意避免反复冻融；

运输条件：干冰/冰袋混装。

## IV 注意事项

### 1. PCR 产物

用于连接反应的 PCR 产物须是平末端片段。由于大多数 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 扩增的 DNA 片段，其 3'端附加有一个“A”碱基，因此请勿使用 Taq DNA 聚合酶扩增目的片段，推荐使用 Pfu 聚合酶或靶点 PCR 试剂盒（GeneCopoeia Cat#IC003）进行实验研究。

### 2. 裂解细胞液扩增目的片段

若直接利用裂解液作为 PCR 模板时，推荐使用靶点 PCR 试剂盒（GeneCopoeia Cat#IC003）扩增目的片段，试剂盒包含裂解缓冲液及 PCR Mix，实验操作简便，特异性高，并使用 T7 核酸内切酶 I 检测试剂盒（GeneCopoeia Cat#IC005）检测点突变结果，GeneCopoeia 也提供靶点 PCR 引物设计及合成服务。

详情请咨询官方网站：[www.igenebio.com/product/indelcheck-detection-system/](http://www.igenebio.com/product/indelcheck-detection-system/)

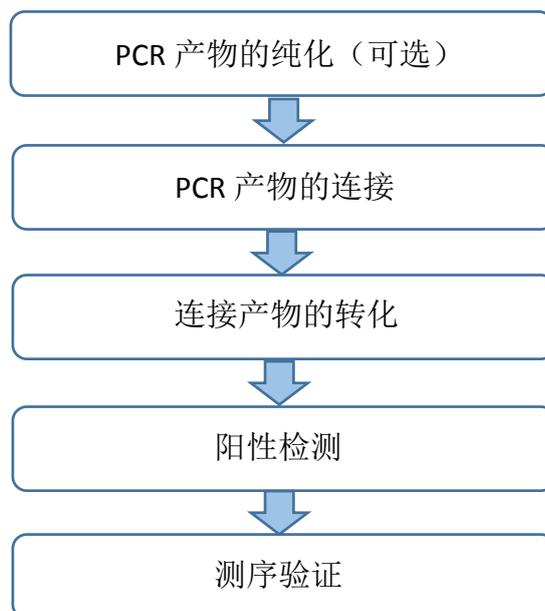
### 3. 长片段 PCR 产物的连接

当插入的目的片段较长时（>1500 bp），琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物单一，无非特异性产物，连接前建议进行 PCR 产物定量（如 Qubit 定量等），并保证连接体系中目的片段最低量有 30 ng。若出现非特异性扩增，建议进行胶回收纯化并通过 NanoDrop 定量后再进行连接反应。

### 4. 试剂盒的储存

请将试剂盒储存于-20℃。由于 T4 DNA Ligase 耐热性较差（68℃失活），因此使用前请将所需组份置于冰上解冻完全后使用。另外，5× Ligase Buffer 解冻后可能会出现白色沉淀，振荡使其重新溶解后即可进行实验操作。

## V 操作流程



## 1. PCR 产物的纯化（可选）

通过琼脂糖凝胶电泳确认 PCR 产物的质量，其应显示为非特异性产物的单一条带（如图 2 所示）。从每个 PCR 反应中取出 5-10 $\mu$ l 进行琼脂糖凝胶电泳，以验证 PCR 产物的质量和数量。若 PCR 产物显示为非单一条带，建议在连接反应之前对产物进行胶回收纯化。

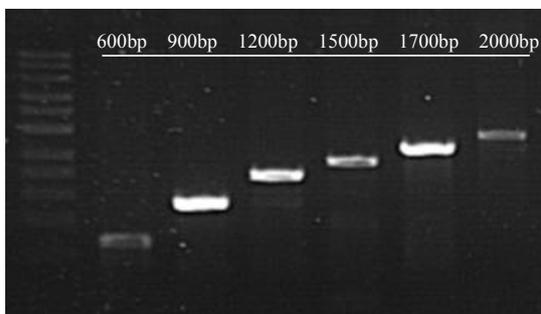


图 2. PCR 平末端产物琼脂糖凝胶电泳图

## 2. PCR 产物的连接

连接实验体系如下：

试剂	体积	终浓度/量
5 $\times$ Ligase Buffer	2 $\mu$ L	1 $\times$
Blunt-end linear vector	1 $\mu$ L	20ng
PCR 产物	1 $\mu$ L*	$\geq$ 30ng*
ddH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ L*	—
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ L	200U
<b>Total</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>	

注：\*根据 PCR 产物的浓度进行加样，若琼脂糖凝胶电泳条带亮度不太明亮，则建议进行 PCR 产物定量（如 Qubit 定量等），适当提高目的片段的量，保证连接体系中目的片段最低量有 30 ng。

将连接体系置于 25 $^{\circ}$ C 水浴锅中连接 1 h。

## 3. 连接产物的转化

3.1 将 *E.coli* 感受态细胞置于冰上融化。按实验需要准备足够的离心管并置于冰上，各分装 100  $\mu$ L 融化后的 *E.coli* 感受态细胞。

3.2 每管 100  $\mu$ L 感受态细胞（建议转化效率为  $1 \times 10^9$ ）加入 2  $\mu$ L 的连接产物，冰上孵育 30 min。

3.3 将离心管置于 42 $^{\circ}$ C 恒温环境下热激 45s，然后迅速置于冰上孵育 3 min。

3.4 每管加入 400  $\mu$ L 的 SOC（或 LB）培养基，37 $^{\circ}$ C 220 rpm 摇床培养 1 h。

3.5 取 200  $\mu$ L 培养液涂布于 Amp<sup>+</sup>（抗生素建议浓度为 100  $\mu$ g/mL）LB 平板，37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

#### 4. 阳性检测

于每个平板上随机挑取数个（例如 10 个）菌落进行 PCR 验证，使用本试剂盒中的 Forward sequencing primer(20 μM)/Reverse sequencing primer(20 μM)检测阳性菌落，请参考您的 PCR 反应体系供应商提供的指引进行 PCR 反应。

例如：

试剂	体积	终浓度/量
2× PCR buffer	12.5μL	1×
Forward sequencing primer(20μM)	1μL	0.8μM
Reverse sequencing primer(20μM)	1μL	0.8μM
dNTP(25mM)	0.2μL	0.2mM
Enzyme(5U/μL)	0.2μL	1U
ddH <sub>2</sub> O	9.1μL	—
colony	1μL	—
<b>Total</b>		<b>25μL</b>

PCR 反应程序为：

步骤	温度	时间	循环数
1	94℃	5 min	1 cycle
2	94℃	30 s	30 cycles
	58℃	30 s	
	72℃	1 min*	
3	72℃	5 min	1 cycle

\*根据片段长度调整延伸时间，普通 Taq DNA 聚合酶的延伸速率约为 1000 bp/min。

#### 5. 测序验证

5.1 接种检菌阳性的单菌落于 4-5 mL 的含有 Amp<sup>+</sup>（抗生素建议浓度为 100 μg/mL）LB 液体培养基中，37℃ 220 rpm 摇菌过夜培养。

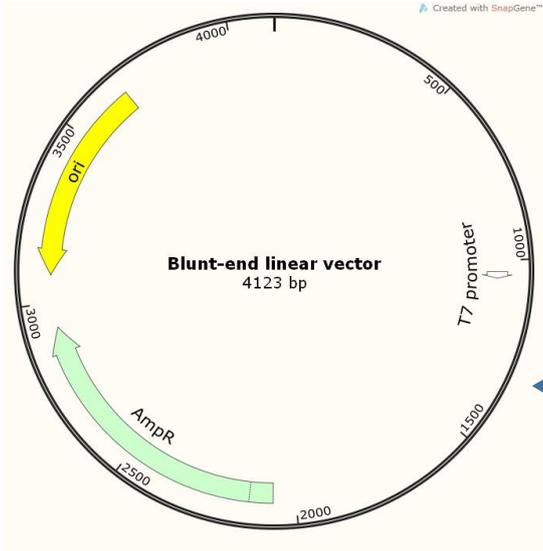
5.2 按照您的质粒提取试剂盒供应商提供的指引提取质粒。

5.3 使用 Forward sequencing primer（20 μM）以及 Reverse sequencing primer（20 μM）特异性引物进行测序验证。

Blunt-end linear vector 的部分载体序列及引物序列信息如下所示：

```

TTAATACGACTCACTATAGGGCTAGCGATCGCCATGGAATAAGTAAAGGAATCACATGGCACAGGTTATCAACACGTTTGACGGGGTTGC
AATTATGCTGAGTGATATCCCGATCGCTAGCGGTACCTTATTCATTTCCCTTAGTGACCGTGTCCAATAGTTGTGCAAAGTCCCAACG
T7 promoter
GGATTATCTTCAGACATATCATAAGCTACCTGATAATTACATTACAAAATCAGAAGCACAAGCCCTCGGCTGGGTGGCATCAAAAGGGAA
CCTAATAGAAAGTCTGTATAGTATTCGATGGACTATTAATGTAATGTTTGTAGTCTCGTGTTTCGGGAGCCGACCCACCGTAGTTTCCCTT
CCTTGCAGACGTCGCTCCGGGGAAAAGCATCGGCGGAGACATCTTCTCAAACAGGGAAAGGCAAAGTCCAGGGCAAAGCGGACGAACATG
GGAACGCTGCGAGCGAGGCCCTTTTCGTAGCCGCTCTGTAGAAGAGTTTGTCCCTTCCGTTTGAGGTCCCGTTTTGCCTGCTTGATC
GCGTGAAGCGGAT ATCAACTATACATCAGGCTTCAGAAATTCAGACGGGATTCTTTACTCAAGCGA
CGCACTTCGCCTA TAGTTGATATGTAGTCCGAAGTCTTTAAGTCTGGCCTAAGAAATGAGTTCGCT
CTGGCTGATTTACAAAACAACGGACCATTATCAGACCTTTACAAAAATCAGATAATGTTTAA 3'
GACCGACTAAATGTTTTGTTGCTGGTAATAGTCTGGAAATGTTTTTAGTCTATTACAAAT 5'
GTTGCCTGGTAATAGTCTG
Reverse sequence primer
    
```



Forward Sequencing Primer: 5'-agaagcacaagcctcgg-3'  
 Reverse Sequencing Primer: 5'-gtctgataatgtccgttg-3'

### 6. Control Insert 的连接（阳性克隆对照）

为确保实验的顺利进行，初次使用试剂盒时建议同时建立 Control Insert (40 ng/μL) 的连接实验，帮助实验结果的准确判断。

Control Insert 的连接实验反应体系如下所示：

试剂	体积	终浓度/量
5× Ligase Buffer	2 $\mu$ L	1×
Blunt-end linear vector	1 $\mu$ L	20 ng
Control Insert	1 $\mu$ L	40 ng
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ L	200 U
ddH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ L	—
<b>Total</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>	

- 6.1 将反应体系置于水浴锅中 25℃连接 1 h。
- 6.2 取 2  $\mu$ L 的连接反应产物于 100  $\mu$ L 的 *E.coli* 感受态细胞中(建议转化效率为  $1 \times 10^9$ )
- 6.3 转化步骤及阳性率检测参考上文 V.3 和 V.4。

## VI. 常见问题及解决措施

常见问题	原因分析	解决措施
菌落数少	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 片段纯化过程中存在大量的损失</li> <li>2. 连接体系中插入片段的质量过低</li> <li>3. 感受态细胞转化效率低</li> <li>4. PCR 产物为粘性末端（例如使用 Taq 酶）</li> <li>5. PCR 产物浓度较低时，连接反应加入过多的 PCR 产物</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 确保产物的浓度，尽可能减少回收过程中片段的损失</li> <li>2. 插入片段的量最低为 30ng，请参考上文的 Control Insert 连接测试</li> <li>3. 感受态细胞的转化效率对转化子的获得非常重要，转化效率建议为 <math>1 \times 10^9</math></li> <li>4. 使用 Taq 酶扩增的产物需进行末端平滑化处理</li> <li>5. PCR 体系中的高盐离子浓度将抑制 T4 DNA Ligase 的活性，连接体系中的 PCR 产物的体积请勿超过 4<math>\mu</math>L</li> </ol>
阳性率低	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. PCR 产物不特异，有非特异性产物，且未纯化回收目的片段</li> <li>2. 操作过程中引入了核酸酶</li> <li>3. 插入片段为特殊片段（例如高 GC 含量的片段）</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. PCR 产物有非特异性产物会降低连接阳性率，若产物不特异，请将产物进行回收纯化后进行连接</li> <li>2. 规范操作，确保试剂在使用过程中的洁净度</li> <li>3. 特殊或克隆困难的片段，请特殊处理，例如 PCR 体系中可适量添加 DMSO 并使用 Pfu 聚合酶扩增目的片段</li> </ol>
质粒产量低	培养基不充足、培养基不含抗生素或培养时间较短	建议单个阳性菌落接种于 4-5mL 的含有氨苄青霉素的 SOC 或 LB 培养基中，于 37℃ 220rpm 摇床过夜培养

## VII. 有限使用许可及质保声明

### 使用限制

以下条款适用于 SmartJoin™ Target Site PCR Cloning Kit 产品。若您不能接受这些条款，请在 5 个自然日内将产品完整退还给 GeneCopoeia。产品购买者需遵守最终用户限制许可条例。本产品仅限购买者内部研究使用，不得用于人体或诊断、治疗。未 GeneCopoeia 事先书面同意，本产品不得转售，不得重新包装或修改后转售，不得用于生产商用产品。

### 质量保证

GeneCopoeia 保证产品与产品数据表中描述的规格保持一致。若经 GeneCopoeia 证实产品未达到规格要求，GeneCopoeia 将为您替换产品。若无法替换，GeneCopoeia 将退款给购买者。此质量保证仅适用于最初产品购买者。GeneCopoeia 仅负责替换产品或退还实际的购买金额。对于由使用或不正确使用产品产生的损害或使用其他相关材料和试剂产生的损耗，GeneCopoeia 不承担责任。GeneCopoeia 不提供任何形式的明示的或者默示的保证，包括对适销性、适用于特定用途的默示保证。

GeneCopoeia 致力于为消费者提供高质量的研究产品。如果您对 GeneCopoeia 的产品有任何问题或疑虑，请拨打电话 4006-020-200 联系我们。

© 2018, GeneCopoeia, Inc

GeneCopoeia, Inc.  
9620 Medical Center Drive  
Rockville, MD 20850  
Tel: 301-762-0888 Fax: 301-762-3888  
Email: [inquiry@genecopoeia.com](mailto:inquiry@genecopoeia.com)  
Web: [www.genecopoeia.com](http://www.genecopoeia.com)

广州易锦生物技术有限公司  
广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路 3 号  
广州国际企业孵化器 F 区 8 楼  
邮编: 510663  
电话: 4006-020-200  
邮箱: [sales@igenebio.com](mailto:sales@igenebio.com)  
网址: [www.genecopoeia.com](http://www.genecopoeia.com) (英文) [www.igenebio.com](http://www.igenebio.com) (中文)