

# 百格 EXclone 克隆试剂盒使用说明书

## 目录

EXclone 快速使用说明书	2
EXIN 反应	2
EXTO 反应	2
EXclone 产品介绍	2
简介	3
产品特点	4
产品组分	4
操作流程	4
EXIN 反应	4
1. 设计引物	4
2. PCR 扩增	4
3. 选择 EXclone 载体	5
4. 建立 EXIN 反应体系	5
5. 孵育	5
6. 转化	5
EXTO 反应	6
1. 制备含有目的片段的 pEXIN 质粒	6
2. 选择 EXclone 载体	6
3. 建立 EXTO 反应体系	6
4. 孵育	6
5. 转化（请参考 EXIN 反应的转化步骤）	6
常见问题与解决方法	7

# EXclone 快速使用说明书

这是一份 EXclone 快速使用说明书，如果您是第一次使用 EXclone 克隆系统，请务必参考详细使用手册（可从 [www.biogle.cn/exclone](http://www.biogle.cn/exclone) 下载）。

## EXIN 反应

Step 1. 设计带有 16-bp 末端的引物，PCR 扩增目标片段并纯化

Forward: 5- TCAGCAGTCGAAGAGC+(18-25 matched bp)

Reward: 5- TTAGCGTGTGAAGAGC+(18-25 matched bp)

Step 2. 从 EXclone 载体库选择入门载体或目标载体

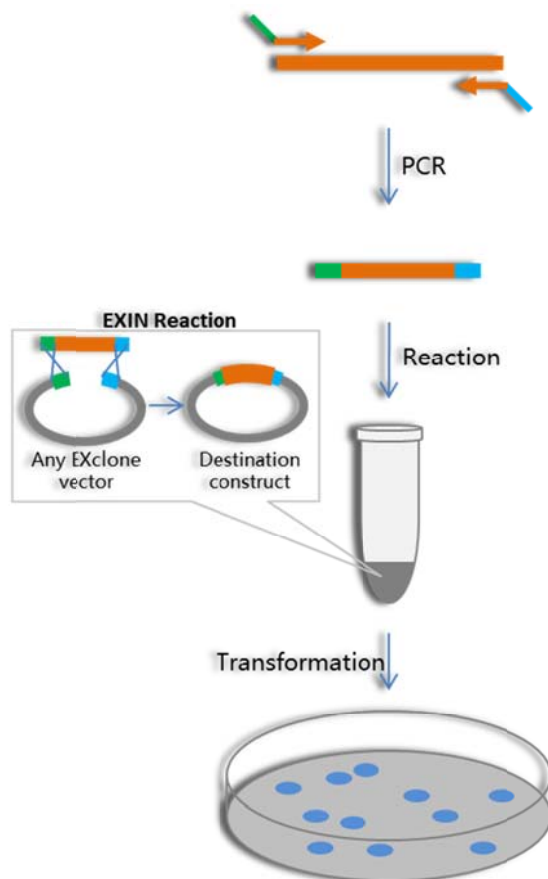
Step 3. 建立 EXIN 反应体系

5X EX-Buffer	2 $\mu$ l
EX-Vector	2 $\mu$ l
EXclonase Enzyme	1 $\mu$ l
Your Insert DNA	X*
H <sub>2</sub> O	x
Total	10 $\mu$ l

\* Insert 最佳用量 = 片段长度 (kb) \* 10 ng, 适用范围为 0.1~50 ng。重要：请勿超过 50 ng, 会抑制反应。

Step 4. 将反应体系混合后置于 37°C 孵育 30 分钟，然后于室温(20°C)继续放置至少 15 分钟（推荐采用 PCR 仪）

Step 5. 取 5  $\mu$ l 反应液，参考标准步骤转化大肠杆菌



## EXTO 反应

Step 1. 制备含有目的片段的 pEXIN 质粒，建议稀释至 10ng/ $\mu$ l

Step 2. 从 EXclone 载体库选择目标载体

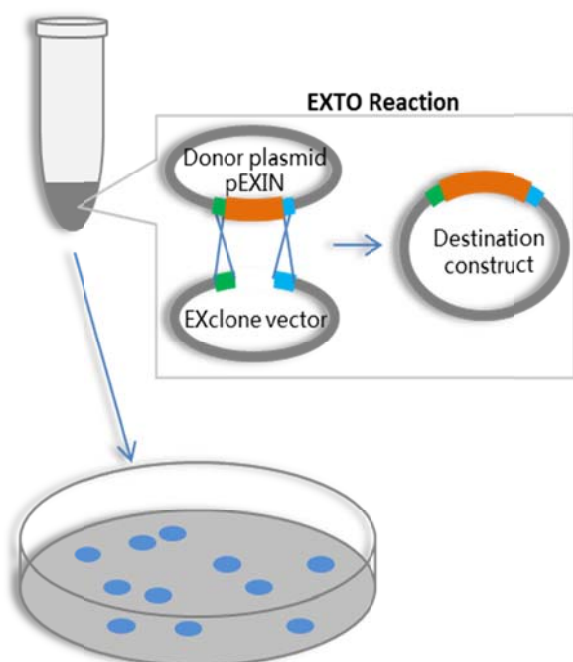
Step 3. 建立 EXTO 反应体系

5X EX-Buffer	2 $\mu$ l
EX-Vector	2 $\mu$ l
EXclonase Enzyme	1 $\mu$ l
pEXIN-Insert Donor plasmid	X*
H <sub>2</sub> O	x
Total	10 $\mu$ l

\* Insert 最佳用量 = 片段长度 (kb) \* 2 ng, 适用范围为 0.1~20 ng。重要：请勿超过 20 ng, 会抑制反应。

Step 4. 将反应体系混合后置于 37°C 孵育 60 分钟，然后于室温(20°C)继续放置至少 15 分钟（推荐采用 PCR 仪）

Step 5. 取 5  $\mu$ l 反应液，参考标准步骤转化大肠杆菌



# EXclone 产品介绍

## 简介

EXclone Kit 是一款媲美 Gateway 系统的简便高效的克隆试剂盒，无需酶切，一个体系，一步反应即可实现：1) 将 PCR 片段快速定向克隆到任意 EXclone 载体；2) 将目的片段从入门载体直接转移到任意目标载体。EXclone 系统提供强大的 EXclone 载体库，只需提供目标 DNA 片段或入门载体，便可通过一步反应直接转移到任意 EXclone 载体，避免反复测序，一次克隆，解决所有。EXclone 系统包含 2 个反应：

EXIN 反应：将 PCR 片段一步克隆到包括入门载体 pEXIN 在内的任意 EXclone 载体

EXTO 反应：将入门载体 pEXIN 中的目标片段一步克隆到所需的任意 EXclone 载体

- 无需酶切
- 一步反应
- >90%阳性率
- 同时兼容入门克隆和亚克隆

— EXIN Reaction  
— EXTO Reaction



EXclone 克隆路线示意图

---

## 产品特点

- 简易 —— 无需酶切，一管混合，一步反应
- 方便 —— 可将入门载体中的目标片段通过一步反应直接转移到任意 EXclone 载体，避免反复测序，一次克隆，解决所有
- 快速 —— 37°C 反应 30~60 分钟即可
- 高效 —— 1000 个以上的菌落数，>90% 以上的阳性率，提供您所需的克隆
- 灵活 —— 同时用于入门克隆和亚克隆，兼容平末端和粘性末端
- 集成 —— 强大的 EXclone 载体库（涵盖适用于大肠杆菌、酵母、昆虫、植物、哺乳动物细胞等宿主的目的载体），只需提供克隆片段或入门克隆，便可高效快速构建任意 EXclone 载体，减少错误的产生

---

## 产品组分

EXclone 试剂盒提供 10 次包装，所有组分于 -20°C 保存。

- 5XBuffer 40  $\mu$ l
- EXclonase Enzymes 10  $\mu$ l
- EX-Vector 20  $\mu$ l

## 操作流程

---

### EXIN 反应

EXclone 可系统通过 EXIN 反应，将 PCR 扩增的片段直接克隆到任意的 EXclone 兼容的载体中，包括入门载体 pEXIN。将目标片段克隆至 pEXIN 后，可通过 EXTO 反应，直接将其转移至任意 EXclone 载体，避免反复克隆、测序。

EXIN 反应在一管中通过一步反应即可实现。实验步骤如下：

---

#### 1. 设计引物

用于 EXclone 的 PCR 片段需要在两端加 16 bp 的接头，因此用于扩增该片段的引物需要在其 5' 端加 16 bp。EXclone 提供在线支持工具([www.biogle.cn/exclone](http://www.biogle.cn/exclone))，简化引物设计流程。引物序列设计如下所示：

5' -Primer: 5' - TCAGCAGTCGAAGAGC + (18-25 gene specific nucleotides)

3' -Primer: 5' - TTAGCGTGTGAAGAGC + (18-25 gene specific nucleotides)

#### 2. PCR 扩增

扩增所需的目标 DNA 片段，电泳检测后纯化回收，测定 DNA 浓度。EXclone 技术可

## EXIN 反应 (续)

有效克隆 0.1~8 kb 长度的 PCR 片段。

EXIN 反应所需的 DNA 量非常小,以 1 kb 的 DNA 片段为例,其用量范围为 0.1~50 ng,最佳使用量为 10 ng,当其超过 50 ng 时会影响克隆效率。对于任意一个 DNA 片段,其最佳用量可通过下列公式计算:  $\text{最佳用量} = \text{片段长度}(\text{kb}) * 10 \text{ ng}$  (超过时取 50ng)

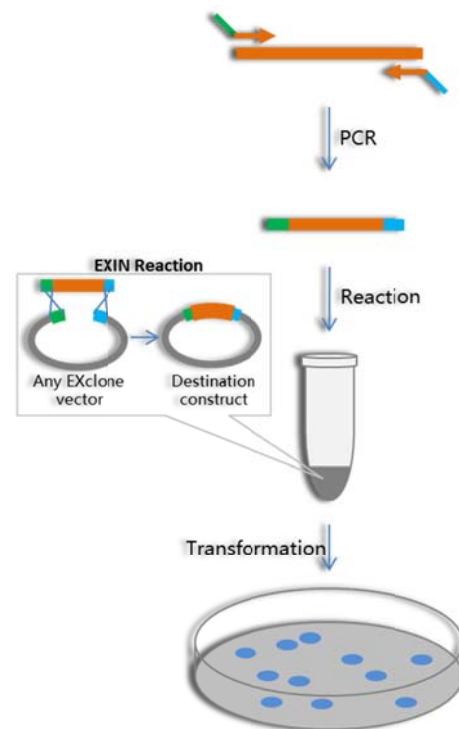
### 3. 选择 EXclone 载体

百格提供强大的 EXclone 载体库,涵盖适用于大肠杆菌、酵母、昆虫、植物、哺乳动物细胞等宿主的目的载体。载体列表及其详细信息可通过访问 [www.biogle.cn/exclone](http://www.biogle.cn/exclone) 获得,并可在线实现虚拟克隆,下载构建好的载体图谱(Genbank 格式)。

### 4. 建立 EXIN 反应体系

推荐在 200- $\mu\text{l}$  PCR 管中建立如下反应体系,缩小反应体积会降低实验稳定性,影响克隆效率。

5X EX-Buffer	2 $\mu\text{l}$
EX-Vector	2 $\mu\text{l}$
EXclonase Enzyme	1 $\mu\text{l}$
Your Insert DNA	X*
H <sub>2</sub> O	x
<hr/>	
Total	10 $\mu\text{l}$



\*Insert 最佳用量 = 片段长度(kb) \* 10 ng, 适用范围为 0.1~50 ng。重要: 请勿超过 50 ng, 会抑制反应。

### 5. 孵育

将反应体系混合后置于 37°C 孵育 30 分钟,然后于室温(20°C)继续放置至少 15 分钟,延长 20°C 反应时间至 1 小时可增加克隆效率,推荐在 PCR 仪中进行孵育(请取消或降低热盖温度)。反应结束后可将反应液置于 4°C 数小时直至完成准备工作。

### 6. 转化

取 5  $\mu\text{l}$  反应液加到至少 50  $\mu\text{l}$  的感受态细胞中,混匀后冰浴静置 30 分钟(期间切勿晃动,严格保持静置);轻轻取出,42°C 热激 60 秒,立即置于冰上 2 分钟;加入 500  $\mu\text{l}$  SOB/LB,37°C 200 rpm 培养 1 小时;取适量菌液涂布于含有对应抗生素的 LB 平板上,过夜培养。

建议采用转化效率  $>1 \times 10^8$  cfu/ $\mu\text{g}$  的感受态细胞,低转化效率的感受态细胞会直接影响菌落数量。

## EXTO 反应

EXTO 反应以入门载体 pEXIN 质粒为供体 DNA, 可将 pEXIN 中的目的片段直接克隆到任意的 EXclone 兼容的载体中, 避免反复克隆、测序。EXTO 反应在一管中通过一步反应即可实现, 实验步骤如下:

### 1. 制备含有目的片段的 pEXIN 质粒

EXTO 反应以入门载体 pEXIN 质粒为供体 DNA, 因此首先需要将目的片段通过 EXIN 反应克隆至 pEXIN 载体 (可从 EXclone 载体库购买)。成功构建后采用质粒提取试剂盒制备质粒, 建议稀释至 10 ng/μl。因为 EXTO 反应所需的 DNA 量非常小, 以 5kb 的质粒为例, 其用量范围为 0.1~20 ng, 最佳使用量为 10 ng, 当其超过 20 ng 时会影响克隆效率。对于任意一个 DNA 片段, 其最佳用量为:  $\text{最佳用量} = \text{质粒全长 (kb)} * 2 \text{ ng}$  (超过时取 20ng)

### 2. 选择 EXclone 载体

百格提供强大的 EXclone 载体库, 涵盖适用于大肠杆菌、酵母、昆虫、植物、哺乳动物细胞等宿主的载体。载体列表及其详细信息可通过访问 [www.biogle.cn/exclone](http://www.biogle.cn/exclone) 获得, 并可在线实现虚拟克隆, 下载构建好的载体图谱 (Genbank 格式)。

### 3. 建立 EXTO 反应体系

推荐在 PCR 管中建立如下反应体系, 缩小反应体积会降低实验稳定性, 影响克隆效率。

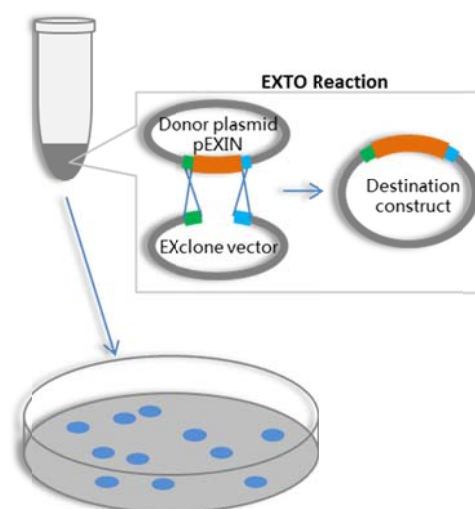
5X EX-Buffer	2 μl
EX-Vector	2 μl
EXclonase Enzyme	1 μl
pEXIN-Insert Donor plasmid	X*
H <sub>2</sub> O	x
<hr/>	
Total	10 μl

\* 供体质粒最佳用量 = 质粒全长 (kb) \* 2 ng, 适用范围为 0.1~20 ng。重要: 请勿超过 20 ng, 会抑制反应。

### 4. 孵育

将反应体系混合后置于 37°C 孵育 60 分钟, 然后于室温 (20°C) 继续放置至少 15 分钟, 延长 20°C 反应时间至 1 小时可增加克隆效率, 推荐在 PCR 仪中进行孵育 (请取消或降低热盖温度)。反应结束后可将加反应液置于 4°C 数小时直至完成准备工作, 长时间保存请放置于 -20°C 冰箱。

### 5. 转化 (请参考 EXIN 反应的转化步骤)



# 常见问题与解决方法

---

## 1. 转化后无克隆或者克隆数很少

- A. 引物的 16-bp 接头设计或者合成错误，请确认该序列
- B. 采用的 DNA 量过大，特别是 EXTO 反应，所采用的 pEXIN 载体的量必须严格控制，过量的 DNA 会严重抑制反应
- C. DNA 质量欠佳，如果您的片段是胶纯化获得的，会在一定程度上抑制反应
- D. 反应温度控制不够精准，建议采用 PCR 仪进行孵育
- E. 感受态细胞效率不够，建议采用  $>1 \times 10^8$  cfu/ $\mu$ g 的感受态细胞
- F. DNA 序列存在某些未知的特殊结构抑制反应进行，尝试延长 20°C 反应时间，或者更换克隆系统

## 2. 大量不含插入片段的克隆

- A. 平板保存时间过长导致抗性不足，确保抗生素平板是新鲜制备的（一个月之内）。
- B. 反应时间过长

## 3. 大量包含不正确插入片段的克隆

- A. PCR 产物包含非特异性序列，如果 PCR 产物不是单一的一条带，需要进行胶纯化以确保正确片段的克隆。