

无缝克隆试剂盒(兼容低浓度片段)

目录号

BN12027

产品组成

组分	规格(50次)
2xUniclone Seamless Cloning Mix Ver.3	250 μ L
pUC19 Control Plasmid,Linearized(Ampr40 ng/ μ l)	5 μ
Control Fragment(500 bp,20 ng/ μ l)**	5 μ L

*线性化载体，可与试剂盒提供的线性化片段重组，排除实验其他影响因素；

**线性化片段，可与试剂盒提供的线性化载体重组，排除实验其他影响因素。

保存条件

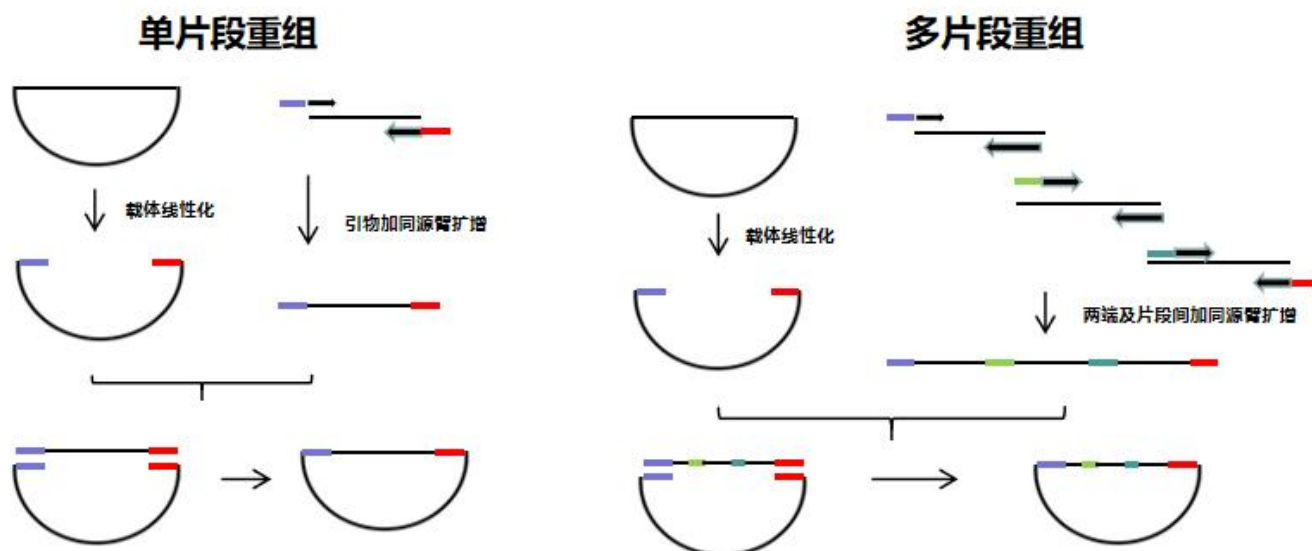
-20℃保存 12 个月，避免反复冻融。

产品简介

无缝克隆试剂盒(兼容低浓度片段)是基于同源重组原理开发的一种简单、快速、高效的无缝克隆技术，能够将任意含有载体末端重叠区域的 DNA 片段重组至线性化载体上，不受酶切位点限制，载体自连背景极低。该方法的实现需要在插入片段正/反向 PCR 引物的 5' 端引入线性化载体上的 15~25 nt 末端序列，通过重组酶的作用使得具有重叠区域的片段和载体最快在 50℃ 5 min 内重组，完成无缝克隆,可同时实现 1~5 个 DNA 片段的重组。

无缝克隆试剂盒(兼容低浓度片段)采用独特重组蛋白 E-T，显著提升对 DNA 投入量的兼容性，对于低浓度 DNA 片段重组效率有着更高的效率。

原理示意图



产品特点

- 快速：可在 5~60 min 内完成重组；
- 简单：不受酶切位点的限制，无需对片段酶切；
- 无缝：不引入额外序列；
- 高效：对多片段重组有着更高的效率。

适用范围

适用于 1~5 个片段的快速无缝克隆、定点突变和高通量克隆等实验。

使用方法

操作示例

1. 线性化载体的制备

选择合适的克隆区域对载体进行线性化（尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域），线性化的方法有酶切制备和反向 PCR 扩增制备。

1) 酶切制备

推荐使用双酶切使载体线性化更完全，以降低转化背景。使用单酶切线性化载体时，可以适当延长酶切时间以减少环状质粒残留。平末端或粘末端均可，但务必保证酶切完全。

注意：

- 经双酶切进行线性化的载体无需去磷酸化，单酶切则需要去磷酸化；
- 酶切完成后，应快速将内切酶失活或对目的产物纯化后再用于重组反应；

- c. 酶切后进行胶回收纯化，推荐纯化后通过琼脂糖凝胶电泳检测产物，可同时与 DNA Marker (目录号：SM811-816) 比较亮度检测浓度。

2) 反向 PCR 扩增制备

推荐使用高保真聚合酶 (目录号：BN24717) 扩增减少碱基突变的概率。推荐使用预线性化质粒为模板，以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。当模板为环状质粒时，扩增产物建议用 *DpnI* 消化后使用。

注意：通过胶回收纯化 PCR 产物，推荐纯化后通过琼脂糖凝胶电泳检测其质量和浓度，可同时与 DNA Marker (目录号：SM811-816) 比较亮度检测浓度。

2. 插入片段的制备

1) 引物设计原则

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' 端引入待重组的线性化载体末端 15~25 nt 的序列 (推荐 18 nt, 不包括酶切位点)，使得扩增后的插入片段末端带有和线性化载体末端一致的同源序列。

F 正向引物 (5' -3') : 上游载体重叠区域+酶切位点 (可选) +正向特异性引物扩增序列

R 反向引物 (5' -3') : 下游载体重叠区域+酶切位点 (可选) +反向特异性引物扩增序列

注意：

- 若载体为粘性末端，且 3' 端突出，则引物设计必须包含突出部分；若 5' 端突出，则引物设计可以包含突出部分，也可以不包含；
- 尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域进行克隆，当载体克隆位点上下游 25 nt 区域内 GC 含量为 40%~60% 时，重组效率最高；
- 计算扩增引物 T_m 值时，只需计算特异性引物的 T_m 值，引入的额外序列无需计算。

示例一：单个插入片段扩增引物设计(以 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切线性化载体为例)

线性化载体序列 (黄色和红色标示分别为上下游同源臂区域，加粗标示为酶切位点序列)：

```
5' -...ggttagagagggttacgcagcaggtGGATCC-----CTCGAGtcaagacgatctacccgagcaataa...-3'
3' -...ccaatctctccgaatgcgtcgtccaCCTAGG-----GAGCTCagttctgctagatgggctcgttatt...-5'
```

插入片段序列 (加粗标示为特异性序列)：

```
tgccagtggcgataagtcgtgtcttacc.....ggcaagacgatagttaccggataaaggcgcag
acggtcaccgctattcagcacagaatgg.....ccgttctgctatcaatggcctattccgcgtc
```

则插入片段扩增引物设计为：

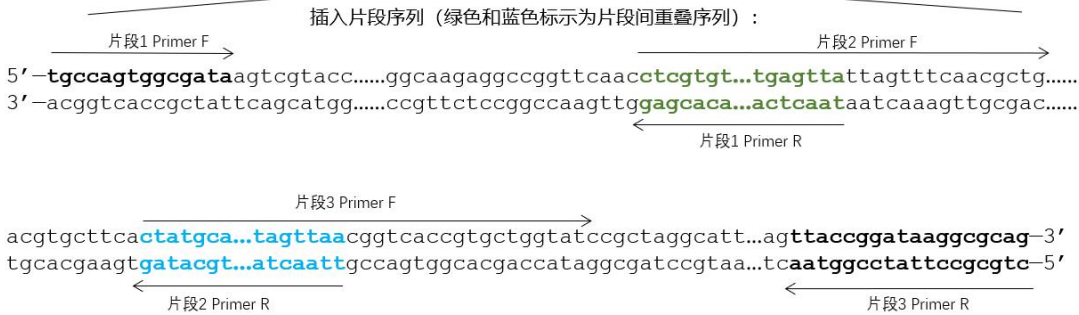
F (5' -3') : **agggttacgcagcaggt**+GGATCC (可选) +**tgccagtggcgata**

R (5' -3') : **gctcgggtagatcgtcttga**+CTCGAG (可选) +**ctgcgccttatccggtaa**

示例二：多个插入片段扩增引物设计（以 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切线性化载体为例）

线性化载体序列（黄色和红色标示分别为上下游同源臂区域，加粗标示为酶切位点序列）：

5'-...ggttaga**gaggcttacgcagcaggt****GGATCC**-----**CTCGAG**tcaagacgatctacccgagcaataa...-3'
3'-...ccaatctctccgaatcgctcggtcca**CCTAGG**-----**GAGCTC****agttctgctagatgggctcg**ttatt...-5'



则片段扩增引物设计为：

片段1：
F (5'-3') : **gaggcttacgcagcaggt**+**GGATCC** (可选) +**tgccagtg****gcgata**
R (5'-3') : **taactca**...**acacgag**

片段2：
F (5'-3') : **ctcgtgt**...**tgagtta**ttagttttcaacgctg
R (5'-3') : **ttaacta**...**tgcatag**

片段3：
F (5'-3') : **ctatgca**...**tagttaa**cggtcaccgtgctggtat
R (5'-3') : **gctcgggtagatcgtcttga**+**CTCGAG** (可选) +**ctgcgccttatccggtaa**

注意：

插入多个片段时引物设计：第一片段的上游引物和第三片段的下游引物，分别按照单片段插入的方式引入载体两端的同源序列即可；片段间同源序列引物设计有三种方式：

- a. 以前一片段 3' 端 15~25 nt 作为同源序列添加至后一片段 5' 端(如示例二图所示)；
- b. 以后一片段 5' 端 15~25 nt 作为同源序列添加至前一片段 3' 端；
- c. 两片段各取一部分作为同源序列(总计 15~25 nt)，分别添加至另一片段末端。

3. 重组反应（推荐 10 μL 体系）

1) 体系的配制

组分	目的重组	阴性对照1	阴性对照2	阳性对照 (可选)
2xUniclone Seamless Cloning Mix Ver. 3	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
线性化载体 (50~200ng)	X μL	X μL	0 μL	1 μL (pUC19Control Plasmid, Linearized)
插入片段 (10~200 ng)	Y μL	0 μL	Y μL	1 μL (Control Fragment)
ddH ² O	Up to 10 μL	Up to 10 μL	Up to 10 μL	Up to 10 μL

- ①：最适载体用量 (ng) = $0.02 \times \text{载体碱基对数}$ ，即 0.03 pmol；
- ②：最适片段用量 (ng) = $0.04 \times \text{片段碱基对数}$ ，插入多片段，每片段最适用量 (ng) = $0.02 \times \text{片段碱基对数}$ 。若插入单片段的长度大于载体，则应互换载体与插入片段用量；若插入片段的长度小于 200 bp，则插入片段应使用 5 倍载体用量；**(推荐载体和插入片段最低投入量在 10-100ng 以内)**
- ③：检验线性化载体中是否有背景质粒残留；
- ④：当插入片段扩增模板是与克隆载体抗性相同的环状质粒时，推荐进行；
- ⑤：用来排除其他操作因素的影响。

注意：

- a. 若按上述公式计算得到的用量超过最低/最高值，则建议直接按最低/最高用量使用；
- b. 若载体片段过长、插入片段过长或片段数过多，克隆阳性率均会降低；
- c. 若某一组分浓度过高可适当稀释后使用，每个组分的用量最好不低于 1 μL 。

2) 反应条件

将上述各个成分轻柔混匀（避免产生气泡，请勿涡旋操作），按如下条件进行反应：

插入片段	反应条件
1~2个插入片段	50 , 5~15 min
3~5个插入片段	50 , 15~30 min

当载体骨架 > 10 kb 或插入片段 > 4 kb 时，建议延长反应时间至 30~60 min。

注意：

- a. 推荐使用 PCR 仪等温控较精准的仪器反应，反应时间不足或太长克隆效率均会降低；
- b. 50°C 反应完成后，建议进行瞬时离心，将反应液收集至管底；
- c. 将反应管置于冰上冷却，建议即时转化。

4. 转化

- 1) 取 100 μL 冰浴上融化的感受态细胞，加入适量重组产物（体积不超过所用感受态细胞体积的 1/10），轻轻混匀，冰上静置 25 min；
- 2) 42°C 水浴热激 45 s，迅速转移至冰浴中，静置 2 min；
- 3) 向离心管中加入 700 μL 不含抗生素的无菌培养基（2×YT 或 LB），混匀后 37°C，200 rpm 复苏 1 h；
- 4) 根据实验需要，吸取不同体积的复苏液均匀涂布到含相应抗生素的 2×YT 或 LB 培养基上，将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养。

5. 阳性克隆的鉴定

- 1) 菌落/菌液 PCR 鉴定：用枪头挑取单菌落至 10 μ L 无菌水中混匀后取 1 μ L 为模板，或直接蘸取菌落至 PCR 体系中扩增（建议至少使用一条通用引物，避免假阳性结果）；
- 2) 以质粒为模板 PCR 鉴定：挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中，37°C，200 rpm 过夜摇菌后抽提质粒作为模板，可使用载体通用引物或特异性引物扩增；
- 3) 酶切鉴定（若有需要）：挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中，37°C，200rpm 过夜摇菌后抽提质粒，使用相应内切酶酶切质粒后电泳检测片段大小；
- 4) 测序：建议使用载体通用引物测序鉴定。

常见问题与解决办法

Q1：克隆数少或不长克隆？

A1：

- 1) 引物设计有误。设计及合成引物时，注意反向引物的序列顺序；
- 2) 插入片段纯度差。对载体和插入片段进行胶回收纯化，电泳检测胶回收产物后再进行连接反应；不推荐多管样品过一个柱子的方式回收 DNA，会造成更多的 EDTA、胍盐等杂质残留，抑制反应；用于重组反应的胶回收产物请溶解于 ddH₂O 中；
- 3) 线性化载体或插入片段比例不佳。请严格按照说明书推荐的方法计算各组分用量，用琼脂糖凝胶电泳检测样品质量及浓度；
- 4) 感受态效率低。自制感受态随着保存时间的增加，效率可能会降低，建议尽量使用新鲜感受态或高效的商业化感受态。

Q2：多数克隆不含插入片段？

A2：

- 1) 克隆载体及片段中含有质粒背景。酶切制备线性化载体时，提高快速内切酶的使用量，延长反应时间，使用胶回收纯化酶切产物；制备插入片段时尽量使用预线性化质粒作为扩增模板，扩增产物进行 *Dpn*I 消化及凝胶回收纯化；
- 2) 相同抗性质粒污染。注意实验环境的清洁及背景质粒的消除。

Q3：克隆含有不正确的插入片段？

A3：PCR 产物中混有非特异性扩增。推荐优化 PCR 体系，提高特异性，使用凝胶回收 PCR 产物。

Q4：菌落 PCR 无条带或大小不对？

A4：

- 1) 引物不正确。推荐使用载体的通用引物或至少使用一条通用引物进行菌 P 鉴定；
- 2) 假阴性结果（插入片段较大）。建议提取质粒为模板进行 PCR 验证或酶切验证。优化 PCR 体系、程序；
- 3) 重组失败。只有空质粒的条带，说明重组不成功，载体线性化不完全，建议优化载体及片段质量。