

# 一步法多片段无缝克隆预混试剂

One-step Seamless Cloning and Assembly Premix

本产品需冰袋运输；-20℃保存，保质期24个月。

## 货号规格

货号	规格
MH201	50次

## 产品内容

组分	规格
Seamless Cloning and Assembly Premix	250 μL
pUC19 Control Plasmid, Linearized (Ampr, 40 ng/μL)	5 μL
500 bp Control Fragment (20 ng/μL)	5 μL

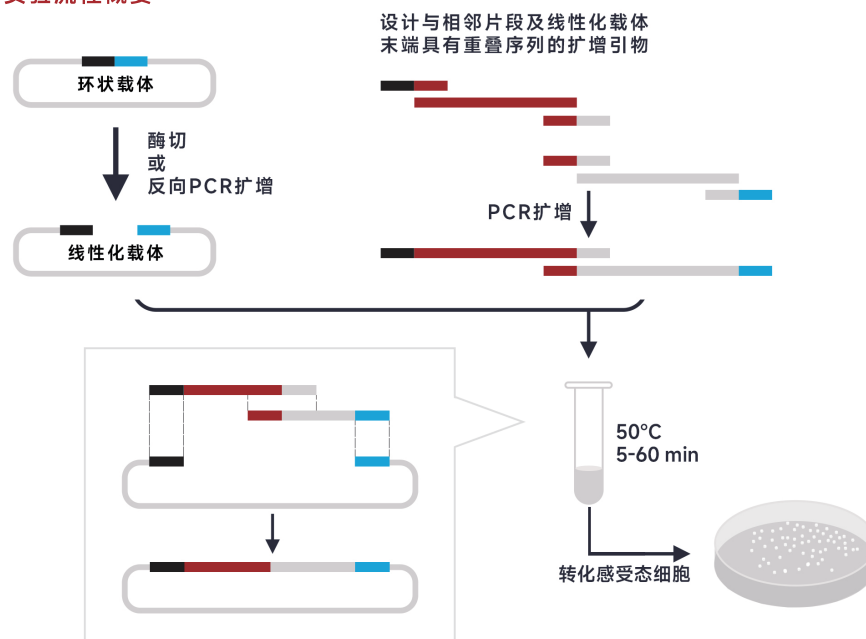
## 产品简介

与传统的克隆方法相比,无缝克隆技术基于基因重组原理,无需繁琐的酶切、连接步骤,以及末端补平等操作,通过插入片段与线性化载体末端同源序列(15~25 nt)的重组,可将 DNA 片段克隆至任意线性载体的任意位点,是一种简洁高效的 DNA 定向克隆技术。

本产品作为新一代重组克隆试剂盒,一次反应即可完成单个至多个 DNA 片段的重组,最快仅需 5 min 即可完成单片段重组,阳性率高达 95% 以上,此外,经过优化的反应体系,能够在一定程度上耐受未纯化 PCR 产物中含有的杂质。

## 操作步骤

### 实验流程概要



## 一、制备线性化载体

尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域作为克隆位点,通过酶切或反向 PCR 扩增,对环状载体进行线性化处理。

注意:当载体克隆位点上下游 20 bp 区域内 GC 含量均在 40%~60% 之间时,重组效率将达到最高。

### 1. 酶切制备线性化载体

推荐使用双酶切,可有效降低转化背景(假阳性克隆);若使用单酶切制备线性化载体,建议适当延长酶切时间,以减少环状载体残留。

注意:① 本产品反应体系中无 DNA 连接酶,不会引发载体自连,即使用单酶切制备线性化载体,也无需进行末端脱磷酸处理;

② 酶切完成后,建议将内切酶失活或将目的产物纯化后再用于后续重组反应。

### 2. 反向 PCR 扩增制备线性化载体

推荐以预线性化质粒作为模板,并使用高保真聚合酶进行载体扩增,从而减少扩增突变的引入,以及消除环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。

注意:建议将 PCR 产物纯化后再用于后续重组反应。

## 二、制备插入片段

### 1. 设计插入片段 PCR 引物

无缝克隆反应要求插入片段 PCR 引物的 5' 端必须包含与其相邻片段(插入片段或载体)末端同源的 15~25 nt(推荐 18 nt) 序列,且引物总长度尽量不要超过 40 bp, T<sub>m</sub> 值一般在 55~65°C, GC 含量一般在 40~60%。设计方案如下:

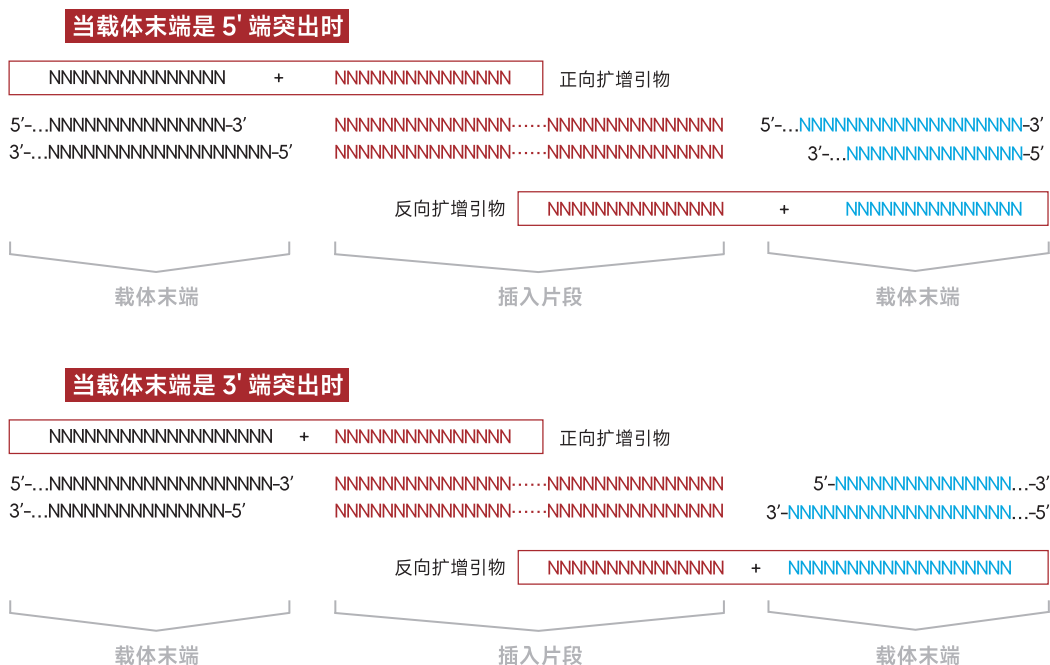
插入片段正向扩增引物:

5'-上游载体末端同源序列 + 酶切位点(可选) + 基因特异性正向扩增序列 -3'

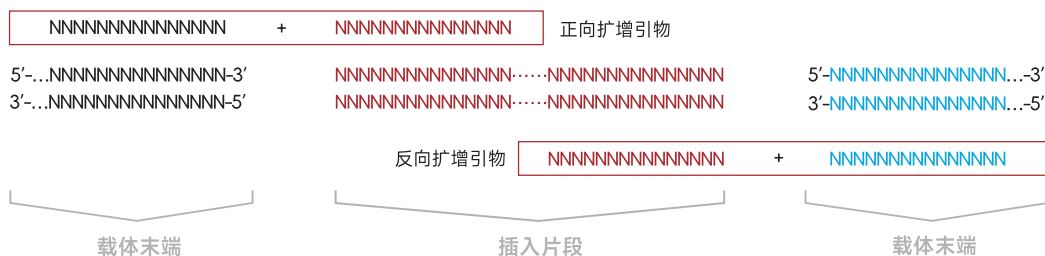
插入片段反向扩增引物:

3'-基因特异性反向扩增序列 + 酶切位点(可选) + 下游载体末端同源序列 -5'

如下图所示

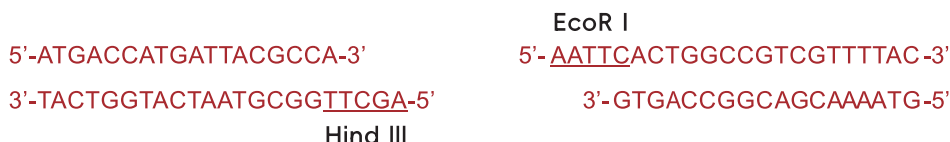


### 当载体末端是平末端时



注意：① 若线性载体为粘性末端，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；

② 本产品所提供的 pUC19 载体 (Ampr) 连接端序列如下：



## 2. 插入片段的 PCR 扩增

推荐使用高保真聚合酶对插入片段进行 PCR 扩增，在扩增结束后，建议先对 PCR 产物进行纯化，再用于无缝克隆反应。

## 三、无缝克隆

### 1. 在冰上配置以下反应体系：

组分	体积及数量	阴性对照	阳性对照
Seamless Cloning and Assembly Premix	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
线性化载体*	50~200 ng	50~100 ng	pUC19 Control Plasmid, Linearized, 1 $\mu$ L
插入片段**	10~200 ng	—	500 bp Control Fragment, 1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	To 10 $\mu$ L	To 10 $\mu$ L	To 10 $\mu$ L

\* 载体最适用量=0.02×载体碱基数(ng)，即0.03 pmol。

\*\* 插入单片段最适用量=0.04×片段碱基数(ng)，即0.06 pmol；当插入多片段时，每片段最适用量=0.02×片段碱基数(ng)，即0.03 pmol。

- 注意：① 当插入片段长度小于 200 bp 时，建议插入片段用量为载体用量的 5 倍；
- ② 当插入单片段长度大于载体长度时，需将上述载体与插入片段用量互换；
- ③ 当按上述公式计算得到的用量超过最小或最大值时，建议直接按表中最小或最大用量操作；
- ④ 若使用的是未经纯化的线性化载体或插入片段，则加样体积不应超过总反应体积的 20%；
- ⑤ 线性化载体过长、插入片段过长或片段数过多，均会导致阳性克隆率下降；
- ⑥ 反应体系配制完成后，需用移液器轻轻吸打混匀各组分，切勿涡旋振荡，以避免产生气泡。

### 2. 将上步配制的反应液瞬时离心后置于 50°C，反应 5~60 min；

- 注意：① 建议使用 PCR 仪等温控较精准的仪器进行反应；
- ② 若插入 1~2 个片段，推荐反应时间为 5~15 min；若插入 3~5 个片段，推荐反应时间为 15~30 min，反应时间不足或过长均会导致克隆效率降低；
- ③ 若载体长度大于 10 kb 或插入片段长度大于 4 kb，建议延长反应时间到 30~60 min；

### 3. 将反应液瞬时离心后置于冰上冷却，用于后续转化操作或者储存于 -20°C。

注意：储存于 -20°C 的重组产物，建议在 1 周内使用。

#### 四、转化

1. 将 100  $\mu\text{L}$  感受态细胞置于冰上解冻;  
注意: 禁止直接用手化冻, 这会影响感受态细胞的活性。
2. 取 5~10  $\mu\text{L}$  步骤三得到的重组产物, 加入上步解冻后的感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰上放置 30 min;
3. 将上述混合液于 42°C 热激 45~60 sec, 然后迅速置于冰上冷却 5 min;
4. 在冷却后的反应液中加入 500  $\mu\text{L}$  SOC 或 LB 培养基 (不添加抗生素), 37°C 振荡培养 (200 rpm, 40~60 min);
5. 取 100~300  $\mu\text{L}$  菌液均匀涂布在含有相应抗生素的平板培养基上, 37°C 倒置过夜培养。  
注意: ① 不同感受态细胞的阳性克隆率会有所差别, 建议使用转化效率  $>10^8$  CFU/ $\mu\text{g}$  的感受态细胞;  
② 阳性对照平板通常会生长出大量白色单菌落, 而阴性对照平板只会长出很少的菌落。

#### 五、阳性克隆鉴定

以下两种方法任选其一即可:

##### 菌落 PCR

挑取单菌落至 10  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 中混匀, 95°C 裂解 10 min, 取 1  $\mu\text{L}$  裂解液作为模板, 进行菌落 PCR 鉴定。

##### 酶切鉴定

挑取单菌落接种至抗性培养基中过夜培养, 提取质粒进行酶切鉴定。

- 注意: ① 检测阳性对照的阳性克隆时, 菌落 PCR 引物可使用通用引物 M13F(TGTA AACGACGG-CCAGT) 与 M13R(CAGGAAACAGCTATGAC), 酶切鉴定需使用 Hind III 与 EcoR I。  
② 菌落 PCR 时建议至少使用一条通用引物, 以避免假阳性结果, 必要时可进一步对阳性结果进行测序鉴定。

### 注意事项

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
2. 本产品仅限科研使用。

### 常见问题

问题描述	可能原因	解决方案
转化效率低	感受态细胞效率低	使用新制备或妥善保存的感受态细胞; 在冰上化冻感受态细胞。
	DNA 片段比例不佳	按照说明书推荐的最适用量和比例配制反应液。
	DNA 片段纯度不够	对线性化载体和插入片段进行胶回收纯化。 注意: 纯化产物应溶解于 ddH <sub>2</sub> O 中, 切勿使用 Tris-EDTA 等缓冲液 (EDTA 等金属离子螯合剂会抑制无缝克隆反应)。
	反应产物过量	在转化体系中, 无缝克隆反应产物体积不应超过感受态细胞体积的 10%。
大量克隆不含插入片段	载体线性化不完全	加大内切酶的使用量; 延长酶切反应时间; 使用胶回收纯化酶切产物。
	平板抗性不足	确保使用正确的抗生素; 使用新鲜制备的抗生素平板。
	相同抗性质粒污染	以质粒为模板进行插入片段 PCR 扩增时, 进行如下优化: 使用预线性化质粒作为扩增模板; 使用 Dpn I 等甲基化敏感型内切酶对扩增产物进行处理; 对 PCR 产物进行胶回收纯化。
大量克隆含有不正确插入片段	非特异性 PCR 扩增产物	优化 PCR 反应体系, 提高扩增特异性; 对 PCR 产物进行胶回收纯化。

