

One Step Seamless Cloning Mix

目录号:

O666044 (20 rxns)

O666044 (50 rxns)

保存条件: -20℃, 保质期一年。

产品内容

Component	20 rxns	50 rxns
2×Cloning MasterMix	100 μ l	250 μ l
PUC19 Vector, Linearized (20 ng/ μ l)	10 μ l	20 μ l
500 bp Control Insert (20 ng/ μ l)	10 μ l	20 μ l
ddH ₂ O	1 ml	1 ml

产品说明

无缝克隆技术是一项简单、高效、快速的 DNA 克隆技术, 可将 DNA 插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。本产品不依赖于 T4 连接酶, 不受载体和目的片段酶切位点的限制, 而直接使用同源重组的方法, 采用特殊的酶将任意方法线性化后的载体与具有线性化载体两端 20-25 bp 重叠区域的 PCR 片段定向重组, 50℃ 反应 5-15 分钟即可快速实现 1-5 个片段的定向无缝克隆。

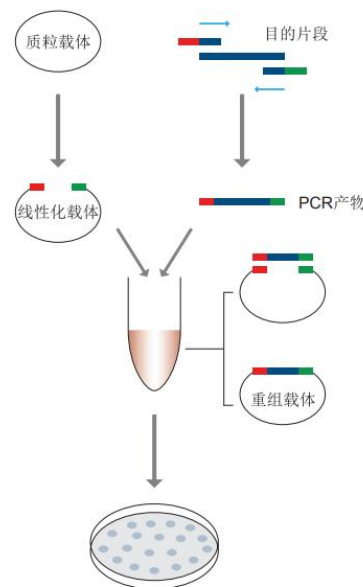


图1 单片段无缝连接原理示意图

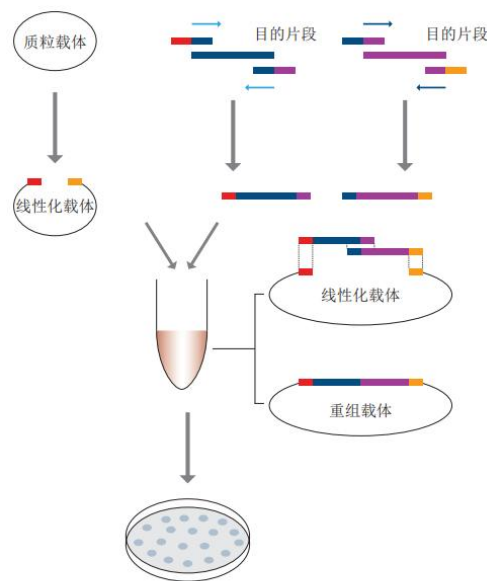


图2 多片段无缝连接原理示意图

产品特点

1. 15 分钟可以将一个或者多个长、短 PCR 扩增片段（平/A 端）插入载体。
2. 不受载体和插入片段酶切位点的可用性和平端/粘性末端的限制，可以在任意位点进行克隆。
3. 无缝克隆，插入点不会引入不需要的碱基序列。
4. 高效、准确，克隆阳性率 >95%。

自备材料与试剂

- 插入片段，特异引物，线性化载体
- 高保真 PCR 试剂（推荐使用 Super Pfx MasterMix）
- 感受态细胞（DH5α Competent Cell、TOP10 Competent Cell）
- 胶回收试剂盒（快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒）
- PCR 仪，PCR 反应管等。

线性化载体和插入 DNA 片段的制备回收

1. 线性化载体的制备回收

（1）选择合适的克隆位点对载体进行线性化，载体线性化方式有两种：限制性内切酶酶切消化，反向 PCR 扩增。

酶切所得线性载体，单酶切或者双酶切均可，酶切后推荐用 PCR 产物纯化试剂盒或者胶回收试剂盒纯化载体。因无缝克隆产品体系中没有 DNA 连接酶，所以不会引起载体自连，重组产物转化后出现的假阳性克隆（无插入片段）是由酶切不完全未线性化环状载体转化而形成的，所以我们推荐酶切后胶回收纯化，可以将未线性化载体比例降低到最低程度。

（2）反向 PCR 扩增得到线性化载体，推荐使用高保真聚合酶扩增，以减少扩增突变的引入，使用环状质粒为模板时，建议使用内切酶 Dpn I 对 PCR 产物进行消化，以减少环状质粒模板残留引起的

克隆假阳性。如果使用 Dpn I 消化质粒模板，需 80°C 加热 20 分钟失活 Dpn I 活性，以避免重组反应时残留 Dpn I 对克隆载体的降解。

2. 插入片段的制备与回收

插入片段的制备可用任意 PCR 酶扩增，克隆过程不受扩增产物平末端或粘末端（A 尾）的影响（重组过程中将被去除，在最终克隆产物中不会出现），但为了减少扩增突变，特别是点突变实验中，建议使用高保真聚合酶（Super Pfx Master Mix）进行扩增。

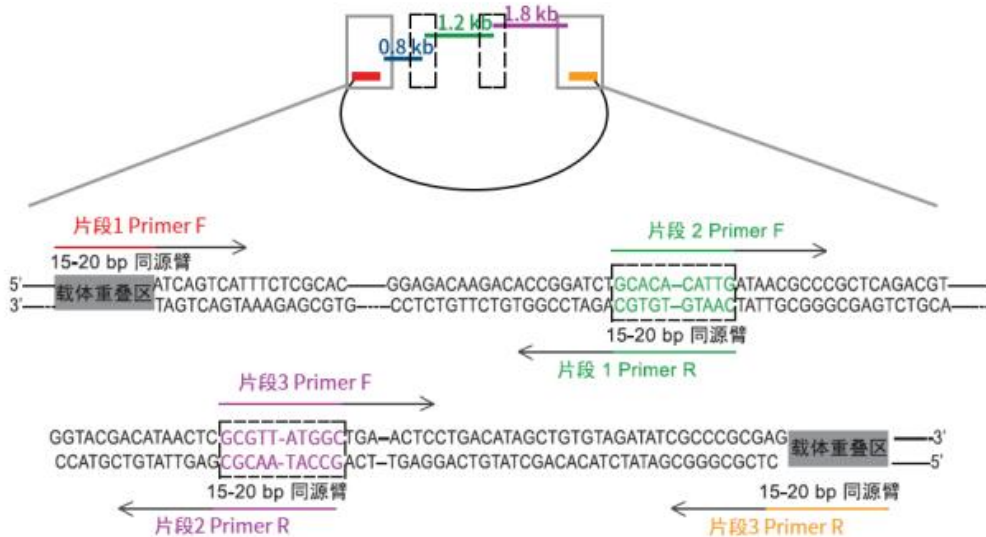
一般情况下，PCR 产物推荐胶回收纯化以降低背景比例，如果插入片段来源于质粒模板，且该质粒与重组载体具有相同抗性，需用内切酶 Dpn I 消化 PCR 产物，以降低背景，提高阳性率。

3. 插入片段的引物设计原则

单片段引物设计原则：在插入片段正反向扩增引物的 5' 端引入线性化载体两末端的同源序列，使扩增后的插入片段两端分别带有和线性化载体两末端对应的同源序列（20-25 bp 不包含酶切位点）
5'-上游载体末端同源序列（20 bp）+酶切位点（可删除）+基因特异性正向扩增引物序列（20 bp）
-3' 5'-下游载体末端同源序列（20 bp）+酶切位点（可删除）+基因特异性反向扩增引物序列（20 bp）
-3'

多片段引物设计原则：载体两端的引物设计原则与单片段克隆时的原则一致，片段之间设计重叠区域引物。多片段引物设计原理：片段 A 的反向引物包含与片段 B 的正向引物 20-25 bp 的重叠区域和特异引物区域，片段 B 的反向引物包含与片段 C 的正向引物 20-25 bp 重叠区域和特异引物区域，依次类推，两端片段引物包含线性载体两末端的同源序列。

如图示：



注：为了提高克隆效率，可增加片段之间的重叠区域并使 Tm 值趋于一致。

操作步骤

1. 线性化载体与插入片段的使用量

1.1 载体一般用 20-50 ng，插入片段与载体的摩尔比在 2:1-3:1 之间最佳；多片段连接 .1 的情况下，片段与片段之间摩尔比为 1:1。

1.2 单片段克隆用量 最适克隆载体使用量= (0.02 x 克隆载体碱基对数) ng (0.03 pmol) 最适插入片段使用量= (0.04 x 插入片段碱基对数) ng (0.06 pmol)

1.3 多片段克隆用量(2-5 个片段) 最适克隆载体使用量=(0.02 x 克隆载体碱基对数)ng(0.03 pmol) 每个插入片段的使用量= (0.02 x 每个插入片段碱基对数) ng (0.03 pmol)

2. 重组反应

注意：2×Cloning MasterMix 含有连接增强剂 PEG，很粘稠，从冰箱拿出来温度低时更粘稠，可以放在手心快速化冻便可降低粘稠度（不影响质量），轻弹混匀。

2.1 按照下表建立反应体系（可使用 EP 管在室温配制）

组分	反应体系
2×Cloning MasterMix	5 μ l
Linear Vector (20-50 ng)	X μ l
Insert(s)	Y μ l
dd H ₂ O	To 10 μ l

2.2 对照反应体系（可选）

组分	反应体系
2×Cloning MasterMix	5 μ l
PUC19 Vector, Linearized (20 ng/ μ l)	3 μ l
500 bp Control Insert (20 ng/ μ l)	1 μ l
dd H ₂ O	To 10 μ l

2.3. 轻轻混匀，在 50℃ 水浴或者 PCR 仪中反应 5-15 分钟，超过 3 个片段的连接，可以延长反应时间至 30 分钟。反应结束后，将 EP 管置于冰上降温后直接转化或者保存于 -20℃。

3. 重组产物转化

3.1 克隆感受态置于冰上解冻，取 10 μ l 反应产物加入 100 μ l 感受态细胞中，轻弹管壁混匀，冰上静置 30 分钟。

3.2 42℃ 水浴热激 90 秒，立即置于冰上 2-3 分钟。

3.3 加入 600 μ l 无抗 LB 液体培养基，37℃ 摇床 220rpm 培养 30 分钟。3.4 5000rpm 离心 5 分钟，弃多余培养液，剩余 100 μ l 菌液重悬菌体，用无菌涂布棒均匀涂布在正确抗性的平板上。

3.5 37℃ 培养箱倒置培养 12-16 小时

4. 阳性克隆的鉴定

可根据具体情况，选择菌落 PCR 鉴定、提取质粒进行限制性内切酶鉴定或测序鉴定。

自备仪器

恒温混匀仪。

实验前准备及重要注意事项

1. 在实验前，应仔细阅读本说明书。
2. Proteinase K 若需长期保存，请放置于 -20℃。

- 使用前请检查 Buffer RLC 是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请将 Buffer RLC 于 56°C 水浴重新溶解。
- 组织样本前处理: 取 20 mg 组织样本放入 1.5 mL 离心管(自备)中, 加入 500 μ L 的 Buffer RLC, 组织匀浆仪打碎后, 12000 rpm (~13400 \times g) 离心 1 分钟, 取 200 μ L 上清为样本。

操作步骤

- 取 1.5 mL 离心管(自备), 加入 500 μ L Buffer RLC, 200 μ L 样本, 20 μ L Proteinase K, 涡旋震荡 5 s 后, 置于室温, 1200 rpm 的恒温混匀仪震荡 10 min。注: 湿拭子样本, 充分震荡混匀后取 200 μ L 进行提取。干拭子样本浸泡于 400 μ L 生理盐水中, 充分震荡混匀后静置 5 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟后, 取 200 μ L 进行提取。
- 瞬离离心管, 将步骤 1 所得溶液加入到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DM) 中。12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
- 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer PGWT, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
- 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer GWT2, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
- 12,000 rpm 离心 2 分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温 2 分钟, 晾干。
- 将吸附柱置于新的收集管 (RNase-Free Centrifuge Tube) 中, 向吸附柱膜的中间部位悬空加入 40-100 μ L RNase-Free Water, 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心 1 min, 收集核酸溶液。置于 -80°C 长期保存。