

One Step Seamless Cloning Kit

一步法无缝克隆试剂盒

产品编号: MA2000 规格: 4rxns / 50rxns

产品内容

产品组成	MA2000-T 4rxns	MA2000-1 50rxns
2×Seamless Cloning Mix	20μL	250μL
pUC19 Control Plasmid, Linearized (AmpR, 40ng/μL)	/	5μL
Control Fragment (500bp, 20ng/μL)	/	5μL

产品简介

One Step Seamless Cloning Kit (一步法无缝克隆试剂盒) 是一款简单、快速、高效的DNA定向克隆试剂盒, 该产品通过同源重组的方法可以将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5'端引入15~25bp的线性化载体末端同源序列, 使得插入片段PCR产物5'和3'末端分别带有与线性化载体两末端对应的完全一致的序列。具有重叠区域的片段和载体在重组酶的作用下, 最快可在50°C反应5min, 即可进行重组, 完成无缝克隆。

本产品可同时实现1~5个DNA片段的重组, 2×Seamless Cloning Mix中采用独特重组蛋白E-T, 对DNA投入量的兼容性好, 对于低浓度DNA片段重组效率高。

本产品适用于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。

保存条件

-20°C保存, 避免反复冻融, 自生产之日起12个月有效。

注意事项

- 1、本产品仅适用于科研领域, 不适用于临床诊断或其他用途。
- 2、为了您的安全和健康, 操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。

使用说明

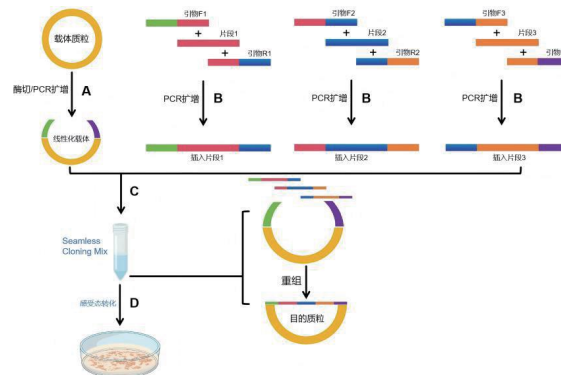


图1. 一步法无缝克隆试剂盒实验流程图

A. 线性化载体制备: 通过酶切或反向PCR获得线性化载体。

B. 插入片段获得: 由PCR制备, 所用扩增引物在设计时需在其5'端添加同源序列 (图中以绿色、红色、蓝色、橙色和紫色标记), 使得扩增产物之间以及扩增产物与线性化载体之间各有15~25bp的同源序列。

C. 重组反应: 将线性化载体和各插入片段按比例混合, 在2×Seamless Cloning Mix催化下, 50°C反应5~30min即可完成重组反应, 实现多个线性化DNA的体外环化。

D. 转化感受态细胞: 重组产物直接进行转化, 平板上会形成数百个单克隆供后期阳性筛选。

(一) 线性化载体制备

选择合适的克隆位点对载体进行线性化, 建议尽量选择无重复序列且克隆位点上下游20bp区域内GC含量在40%~60%之间的位点进行克隆。载体线性化有两种方式: 限制性内切酶酶切、反向PCR扩增。

1. 酶切法制备线性化载体

①双酶切线性化 (首选): 线性化更完全, 可以降低转化背景。

②单酶切线性化: 线性化程度较差。可适当延长酶切时间以减少环状质粒残留, 从而降低转化背景。

【注意】

a. 双酶切线性化的载体无需去磷酸化, 单酶切则需去磷酸化;

b. 酶切完成后, 应快速使反应中的内切酶失活, 或将目的产物纯化后再用于重组。

2. 反向PCR扩增法制备线性化载体

建议使用高保真聚合酶 (美仑货号: MA2001) 进行载体扩增, 从而减少扩增突变的概率。PCR反应体系中可使用0.1~1ng环状质粒模板, 或使用预线性化质粒作为模板, 以减少残留的环状质粒模板对克隆阳性率的影响。

【注意】

a. 载体酶切产物或反向PCR扩增产物纯度较低且有可能含有未线性化环状质粒时, 建议使用试剂盒 (美仑货号: MA0017) 对线性化载体进行胶回收纯化, 并进行琼脂糖凝胶电泳以检测其质量和浓度。

b. 以环状质粒为模板时, PCR产物需使用DpnI进行消化后纯化回收, 以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。



(二) PCR扩增制备插入片段

1. 引物设计原则

①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15~25bp（不包括酶切位点）的待重组线性化载体末端同源序列，使得插入片段5'和3'最末端分别带有和线性化载体末端对应一致的同源序列。

②两侧片段引物设计方式为：

F正向引物：5'—上游载体末端同源序列+酶切位点（可保留或删除）+正向特异性引物扩增序列—3'

R反向引物：5'—下游载体末端同源序列+酶切位点（可保留或删除）+反向特异性引物扩增序列—3'

【注意】

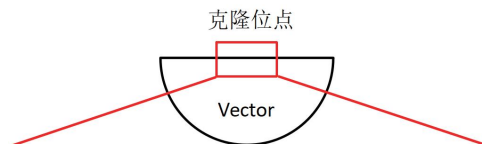
a.若载体为粘性末端，且3'端突出，则引物设计必须包含突出部分；若5'端突出，则引物设计可以包含突出部分，也可以不包含；

b.上/下游载体末端同源序列即线性化载体最末端序列（用于同源重组），GC含量40%~60%为佳。

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

插入片段 5'-ATGATTCTGGACGTG-----GCGGATGAAAACGAG-3'
3'-TACTAAGACCTGCAC-----CGCTACTTTTGCTC-5'

克隆载体



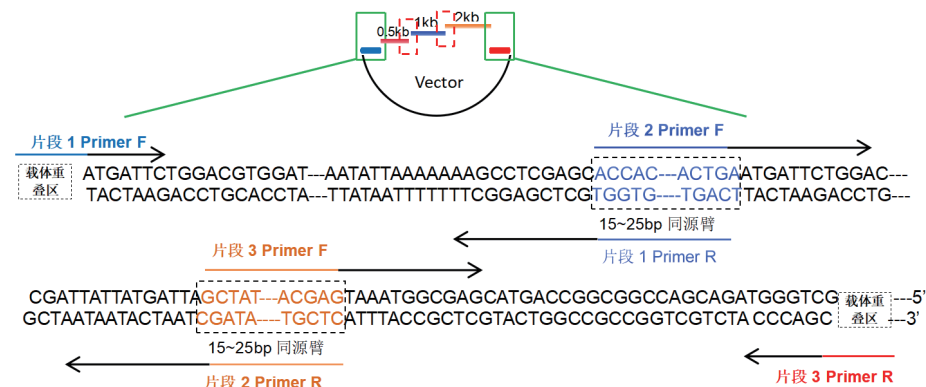
5'-CGACG---ACGCCAAGCTTGCATG---TCGACTCTAGAGGATC---AGCTCGAATTCACGG---TCGAC-3'
3'-GCTGC---TGCCTTTCGAACGTAC---AGCTGAGATCTCCTAG---TCGAGCTTAAGTGACC---AGCTG-5'
Hind III Xba I EcoR I

则插入片段扩增引物设计为：

F正向引物：5'-CGACG---ACGCCAAGCTTATGATTCTGGACGTG-3'
15~25bp同源臂+Hind III+基因特异性正向扩增序列

R反向引物：5'-GAGCT---GATCCTCTAGACTCGTTTTCATCCGC-3'
15~25bp同源臂+Xba I+基因特异性反向扩增序列

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



【注意】

- 两侧片段引物设计按照单片段插入的方式引入载体两端的同源序列即可；
- 以前一片段3'端15~25bp作为同源序列添加至后一片段5'端；
- 以后一片段5'端15~25bp作为同源序列添加至前一片段3'端；
- 两片各取一部分作为同源序列（总计15~25bp），分别添加至另一片段末端。

(三) 重组反应

1. 线性化载体与插入片段使用量计算

重组反应体系最适载体使用量为0.03pmol；最适载体与插入片段摩尔比为1:2~1:3，即最适插入片段使用量为0.06-0.09 pmol。这些摩尔数对应的DNA质量可由以下公式粗略计算获得：

①最适载体使用量 $ng=0.02 \times \text{载体碱基数}$ ，即0.03pmol

②最适插入片段使用量 $ng=(0.04 \sim 0.06) \times \text{插入片段碱基数}$ ，即0.06~0.09pmol

例如，将长度为2kb的片段克隆至长度为5kb的载体时，载体的最适使用量应为 $0.02 \times 5000 = 100ng$ ；插入片段最适使用量应为 $0.04 \times 2000 = 80ng$ 或 $0.06 \times 2000 = 120ng$ 。

【注意】

- 当插入片段长度大于克隆载体时，最适载体与插入片段使用量的计算方式应互换，即插入片段当做载体，载体当做插入片段进行计算；
- 推荐载体和插入片段最低投入量在10~100ng以内，当使用上述公式计算最适使用量超出这个范围时，则选择最低或最高使用量即可；
- 对于单片段同源重组反应，PCR产物无非特异性扩增条带时，可不纯化直接使用（推荐纯化后进行重组），但加入总体积应不超过反应体系体积的1/5，但重组效率会降低；
- 如果最终引物长度超过40bp，推荐在引物合成时选用PAGE纯化，可提高克隆成功率。



2.重组反应体系

组分	目的重组	阴性对照-1 ^a	阴性对照-2 ^b	阳性对照 ^c
2×Seamless Cloning Mix	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
线性化载体 ^d	X μL	X μL	0 μL	1 μL(pUC19 Control Plasmid, Linearized)
插入片段 ^d	Y μL	0 μL	Y μL	1 μL(Control Fragment)
ddH ₂ O	to 10 μL	to 10 μL	to 10 μL	to 10 μL

【注意】

- 阴性对照-1可用来检测线性化载体中是否有环状质粒残留，推荐进行；
- 当插入片段扩增模板是与载体抗性相同的环状质粒时，推荐进行阴性对照-2；
- 可用来排除其他实验材料及操作因素的影响；
- X/Y是根据公式计算得到载体用量和各插入片段用量。若某一组分浓度过高可适当稀释后使用，为了确保加样的准确性，每个组分的用量最好不低于1μL。

3.反应条件

- ①反应体系配制完成后，轻轻吸打混匀各组分，短暂离心将反应液收集至管底。
- ②建议在PCR仪或水浴锅等温控精确的仪器上进行反应。

插入片段	反应温度	反应时间
1~2个插入片段	50℃	5~15min
3~5个插入片段	50℃	15~30min

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

- ③反应完成后，建议将反应管置于冰上冷却5min，以防温度过高影响转化效率。
- ④反应产物可直接进行转化，也可储存于-20℃，一周内有效，待需要时解冻转化。

(四) 重组产物转化

- 1.在冰上解冻克隆用的感受态细胞（如DH5α超级感受态细胞，美仑货号：MB15033）。
- 2.在100μL感受态细胞中加入冷却后的重组产物10μL，轻轻弹击管底或轻轻晃动约2~3次以混匀，立即冰浴静置30min。
- 3.42℃热激45sec，随后立即转入冰浴中，孵育2min。
- 4.然后向管内加入700μL LB培养基（不含抗生素），颠倒混匀后在37℃摇菌1h（150~200rpm）。
- 5.5000×g室温离心1min，吸除部分上清，余下约50~100μL上清，将菌体重悬，用无菌涂布棒在含有相应抗性的平板上轻轻涂匀。待菌液被吸收，将平板倒置，于37℃过夜培养。

(五) 阳性克隆鉴定

- 1.菌落PCR法（首选）：挑单克隆至10μL ddH₂O中混匀，取1μL作为模板；使用合适的正、反向引物进行菌落PCR鉴定，建议至少使用一条通用引物，避免假阳性结果。
- 2.质粒PCR法：挑取单克隆至含相应抗生素的LB培养基中，37℃过夜摇菌（转速200rpm），提取质粒作为模板，可使用载体通用引物或特异性引物扩增。
- 3.酶切法：挑取单菌落至合适抗性的液体培养基中过夜培养后，提取质粒进行酶切鉴定。
- 4.测序鉴定：使用载体上合适引物测序，进行测序分析。

常见问题解答

问题	可能原因	建议
平板上未长出克隆或克隆数目很少	操作原因	建议使用阳性对照，可排除试剂盒操作本身的影响，并进行进一步判定
	引物设计不正确	引物包含15~25bp同源臂（不计算酶切位点），GC含量40%~60%
	线性化载体与插入片段比例不佳	尽量按照说明书中推荐的量和比例配制重组反应体系
	载体和插入片段纯度低	未纯化DNA使用体积不应超过2μL（反应体系体积的1/5）；建议线性化载体、PCR产物进行凝胶回收纯化，纯化产物溶解在ddH ₂ O中
多数克隆不含插入片段或含有不正确的插入片段	感受态细胞效率低	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，确保其转化效率>10 ⁷ cfu/μg
	PCR产物混有非特异扩增产物	优化PCR体系，提高特异性；胶回收PCR产物；鉴定更多的克隆
	载体线性化不完全	可通过阴性对照检测载体是否线性化完全，优化酶切体系，提高限制性内切酶使用量、延长酶切反应时间、胶回收纯化酶切产物
	反应体系中混入了相同抗性的质粒	PCR扩增模板为环状质粒时，如扩增产物未纯化直接用于重组反应时推荐Dpn I消化，或者对扩增产物进行胶回收纯化
	退火温度过低	尝试提高退火温度并设置退火温度梯度
菌落PCR无条带或大小不对	循环数过多	减少循环数至25~30 cycles
	引物不正确	推荐使用载体的通用引物进行菌检，或至少使用一条通用引物
	PCR体系或程序不合适	没有目的条带也没有空质粒条带，建议优化PCR体系、程序；或者提取质粒，以质粒做模板PCR验证；或者进行酶切验证
	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，建议优化酶切体系

S250701

大连美仑生物技术有限公司

官网: <https://www.meilunbio.com/>

电话/邮箱: 0411-62910999 sales@meilune.com

本产品仅供科研使用

