

无缝克隆 (多片段)

货号	品名	规格	储存
YB6007-25	无缝克隆 (多片段)	25 T	-20°C保存, 两年有效
YB6007-50		50 T	



【产品组成】

组分	25T	50T
2x V6 Seamless Cloning Mix	125ul	250 ul

注：微量体积试剂请在正式实验开始前进行瞬时离心操作

【产品概述】

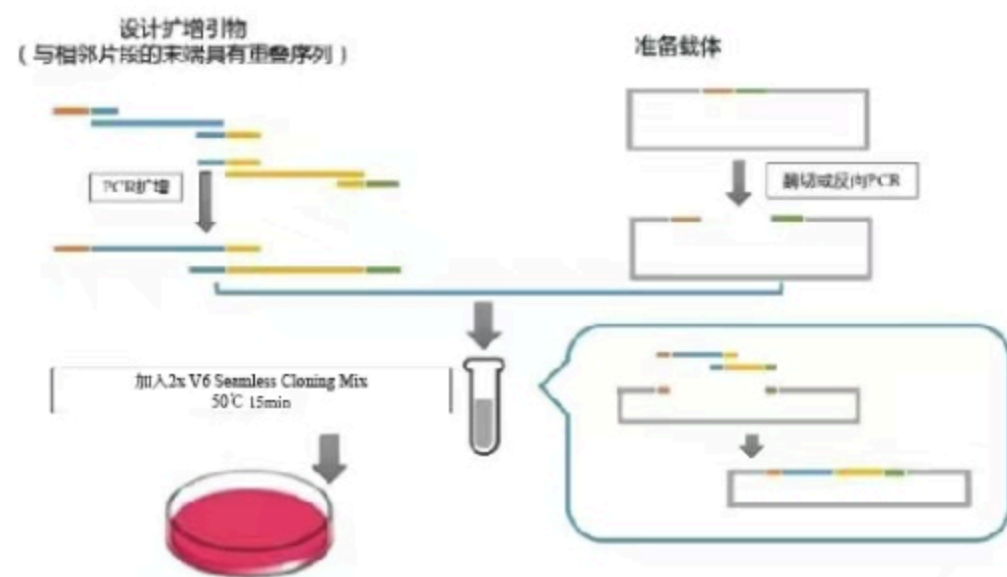
无缝克隆是一种简单、快速并且高效的 DNA 定向克隆技术, 可将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。通过识别 DNA 片段和线性化载体末端的 18 - 25 bp 同源序列, 50°C反应 15 - 60 min 即可将 DNA 片段和线性化载体高效精确地融合在一起, 完成定向克隆, 且克隆阳性率可达 95%以上。

【产品特色】

1. 简单、快速、高效, 可将插入片段克隆至任意线性载体的任意位点;
2. 不依赖连接酶, 无载体自连, 阳性率可达 95%以上;
3. 无需考虑插入片段自身携带的酶切位点;
4. 一次反应可完成单至多个片段重组。

【使用方法】

流程概要图



一、制备线性化克隆载体

选择合适的克隆位点, 对载体进行线性化, 线性化载体可以通过酶切或者反向 PCR 扩增完成。

1. 酶切制备

双酶切：线性化完全, 转化背景 (假阳性克隆) 低;

单酶切：线性化程度差, 可通过适当延长酶切时间来减少环状质粒的残留。

注：(1) 双酶切无需去磷酸化, 单酶切推荐去磷酸化;

(2) 酶切完成后, 应将快速内切酶失活或对目的产物纯化后再用于重组反应。

2. 反向 PCR 扩增制备

载体质粒 DNA 为模板, 克隆位点为分界点, 设计一对反向引物, 推荐使用高保真 PCR Mix 进行扩增。

二、设计插入 PCR 引物片段

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 18~25 nt (推荐 20 nt 不包含酶切位点的同源序列) 序列。假如载体为粘性末端, 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。

插入片段扩增引物：

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'

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'



注：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。

三、插入片段的 PCR 扩增

插入片段可用任意 PCR 酶 (Taq 酶或高保真酶) 扩增, 无需考虑产物末端有无 A 尾 (重组过程中将被去除, 在最终质粒中不会出现)。建议使用高保真聚合酶进行扩增以减少扩增突变的发生。建议使用纯化后的 PCR 产物进行无缝克隆反应, 若 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定为特异性扩增产物, 可直接用于无缝克隆反应, 但加样的体积不宜超过反应总体积的 20%。

四、无缝克隆反应

1. 冰水浴中配制以下反应体系

组分	反应体系	阴性对照
2x V6 Seamless Cloning Mix	5 ul	5 ul
线性化载体 ^a	50-200 ng	50-100 ng
插入片段 ^b	10-200 ng	-
ddH ₂ O	To 10 ul	





a. 最适载体用量 (ng) = $0.02 \times$ 载体碱基对数, 即 0.03 pmol。

b. 插入单片段时, 最适片段用量 (ng) = $0.04 \times$ 片段碱基对数; 插入多片段时, 每片段最适用量 (ng) = $0.02 \times$ 片段碱基对数。

注: (1) 如果插入的单片段长度大于载体, 那么应互换载体与插入片段用量;

(2) 如果插入的片段长度小于 200 bp, 那么要使用 5 倍载体的用量;

(3) 如果按上述公式计算得到的用量低于最低/高于最高值, 那么建议直接按最低/最高用量使用;

(4) 载体或插入片段过长, 片段数量过多, 均会降低阳性率。

体系配制完成后, 轻轻吹吸数次混匀各组分, 避免产生气泡即可, 切勿涡旋。

2. 将反应体系置于 50°C, 反应 15-60 min

注: (1) 推荐使用温控比较精准的仪器进行反应, 如 PCR 仪, 反应时间不足或过长都会降低克隆效率;

(2) 当载体骨架在 10 kb 以上或插入片段在 4 kb 以上时, 建议延长反应时间到 30~60 min;

(3) 50°C 反应完成后, 建议进行瞬时离心, 将反应液收集至管底。

3. 将反应液离心管置于冰水浴中冷却, 直接进行转化或储存于 -20°C

注: -20°C 储存的重组产物, 建议在 1 周内使用。

五、克隆产物转化

在 100 ul 感受态细胞中加入 5-10 ul 反应液, 轻柔吹吸混匀, 置于冰上 30 min。42°C 热激 90 s, 冰浴 3min。加入 800 ul SOC 或 LB 培养基, 37°C 振荡培养 40-60 min (200 rpm)。将菌液均匀涂布在含相应抗生素的平板上, 倒置于 37°C 培养箱培养过夜。

注: (1) 不同感受态细胞最后的克隆阳性率会有所差别, 推荐使用转化效率 >108 cfu/ug 的感受态细胞;

(2) PCR 产物与线性化载体的数量和纯度决定了菌落数;

(3) 阳性对照平板通常生长大量白色单菌落, 阴性对照平板只生长很少的菌落。

六、阳性克隆检测

菌落 PCR 鉴定: 挑取单菌落置于 20 ul 含质粒相应抗生素的 LB 培养基中混匀, 取 1 ul 作模板, 进行菌落 PCR 鉴定 (或者从 20ul 加入菌落的培养基中取 10ul 95°C 裂解 10 min)。

酶切鉴定: 将单菌落接种到抗性培养基中培养过夜, 提取质粒进行酶切鉴定。

注: (1) 建议菌落 PCR 时, 至少使用一条通用引物, 可有效避免假阳性结果;

(2) 必要时可进一步对阳性结果进行测序鉴定。

问题描述	可能原因	解决方法
转化效率低	感受态效率低下	使用新制备或妥善保存的感受态细胞。
	DNA 片段比率不佳	按照说明书推荐的最适用量和比率配制反应体系。常用的吸光测量法易受 DNA 纯度、缓冲液 pH 值等因素影响, 测定偏差较大, 因此推荐使用琼脂糖电泳测定样品浓度。
	DNA 片段纯度不够	对载体和插入片段进行胶回收纯化。由于 EDTA 等金属离子螯合剂会抑制无缝克隆反应, 因此纯化产物应溶解于 ddH ₂ O 中, 切勿使用 Tris-EDTA 等缓冲液。
	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	酶切制备线性化载体时, 提高限制性内切酶使用量, 延长反应时间, 或使用胶回收纯化酶切产物。
	相同抗性质粒污染	以质粒为模板进行插入片段 PCR 扩增时, 使用预线性化质粒作为扩增模板, 使用 DpnI 等甲基化敏感性内切酶对扩增产物进行处理, 或对产物进行胶回收纯化。
	平板抗性不足	确保使用正确的抗生素, 并使用新鲜制备的抗生素平板。

