

产 品 说 明 书

无缝克隆混合酶

产品货号: TG0025

产品规格: 50T

储存条件

-20℃保存, 有效期见外包装。

产品介绍

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。无缝克隆混合酶通过识别 DNA 片段和线性化载体末端的 15-25 bp 同源序列, 50℃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。

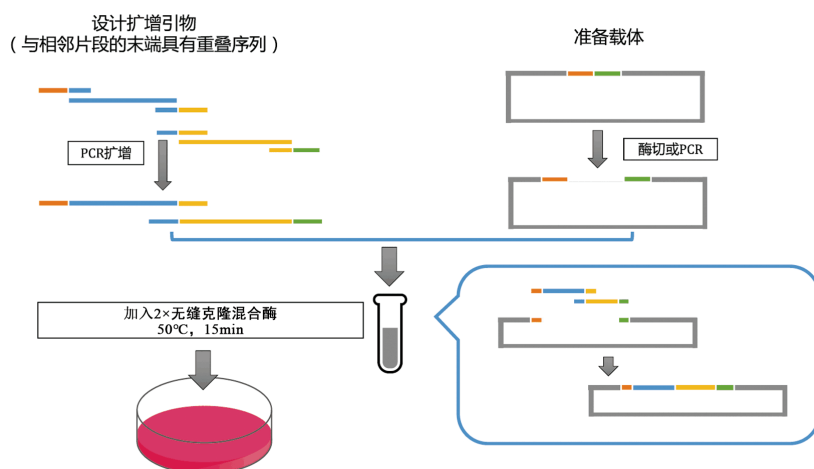
该产品为 2×混合酶形式, 含量为 250 μL, 针对 10 μL 的克隆体系, 可以做 50 次。

产品特点

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. 不依赖于连接酶, 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，单酶切需要去磷酸化；（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。

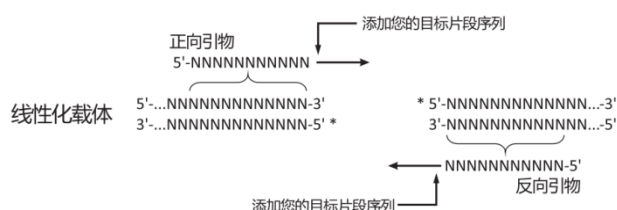
二、设计插入 PCR 引物片段

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 15~25 nt（推荐 18 nt）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
无缝克隆混合酶	5 μ L
线性化载体 1	50-200 ng
插入片段 2	50-200 ng
ddH ₂ O	To 10 μ L

1 最适载体用量（ng）= 0.02 × 载体碱基对数，即 0.03 pmol。

2 插入单片段时，最适片段用量（ng）= 0.04 × 片段碱基对数；插入多片段时，每片段最适用量（ng）= 0.02 × 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℃储存的重组产物，建议在 1 周内使用。

五、克隆产物转化

在 100 μL 感受态细胞中加入 5-10 μL 反应液，轻柔吹吸混匀，置于冰上 30 min。42℃热激 45~60s，冰浴 5 min。加入 500 μL SOC 或 LB 培养基，37℃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℃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 $>10^8$ cfu/ μg 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 10 μL ddH₂O 中混匀，95℃裂解 10 min，取 1 μL 作模板，进行菌落 PCR 鉴定。

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。

