

Universal Cloning kit

通用型同源重组克隆试剂盒

Gecell
Version 02/24

REF: 8800

储运条件:

-20°C 储存 12 个月, 避免反复冻融。 , 2-8°C 运输。

产品组成

组分	规格
2×Uniclone Cloning Mix	250 μL
pUC19 Control Plasmid, Linearized (Ampr, 40 ng/μl)*	5 μL
Control Fragment (500 bp, 20 ng/μl)**	5 μL

*线性化载体, 可与试剂盒提供的线性化片段重组, 排除实验其他影响因素;

**线性化片段, 可与试剂盒提供的线性化载体重组, 排除实验其他影响因素。

产品简介

基于重组原理的无缝克隆技术, 作为新一代的克隆方法, 不依赖繁琐的酶切、连接步骤, 也不需要末端补平等操作, 依据 DNA 片段与线性化载体末端的 15~25 nt 同源序列的重组, 可将插入片段克隆至任意线性载体的任意位点, 载体自连背景极低, 是一种简单、快速、高效的 DNA 定向克隆技术。

本品一次反应可完成 1-5 个 DNA 片段的重组, 最快仅需 5 分钟即可完成单片段重组, 且阳性率高于 95%。
2×Uniclone Seamless Cloning Mix 中添加的辅助因子和优化的反应体系使产品具有更高的阳性率和兼容性。

实验步骤

1. 实验流程概要

2. 线性化克隆载体制备

选择合适的克隆位点，对载体进行线性化（尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域），载体的线性化可以通过酶切或反向 PCR 扩增制备。

① 酶切制备

推荐使用双酶切使载体线性化更完全，以降低转化背景。使用单酶切线性化载体时，可以适当延长酶切时间以减少环状质粒残留，降低转化背景。平末端或粘末端均可，但务必保证酶切完全。

建议酶切后取少量酶切产物进行电泳，以确保全部载体被切开。

- 注意：
- a. 经双酶切进行线性化的载体无需去磷酸化，单酶切则需要去磷酸化；
 - b. 酶切完成后，应快速将内切酶失活或对目的产物纯化后再用于重组反应；
 - c. 酶切后进行胶回收纯化，推荐纯化后通过琼脂糖凝胶电泳检测产物，

② 反向 PCR 扩增制备

建议使用高保真 DNA 聚合酶进行载体的扩增以降低扩增突变的引入。推荐使用预线性化质粒作为模板，以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。当模板为环状质粒时，扩增产物建议用 Dpn I 消化后使用。

注意：通过胶回收纯化 PCR 产物，推荐纯化后通过琼脂糖凝胶电泳检测其质量和浓度，

3. 插入片段 PCR 引物设计

① 引物设计原则

插入片段扩增引物由两部分构成：重叠区域+特异性引物，即在插入片段的正/反向引物的 5' 端引入待重组的线性化载体末端 15~25 nt 的序列（推荐 18 nt，不包括酶切位点），使得扩增后的插入片段末端带有和线性化载体末端一致的同源序列。

F 正向引物 (5' -3')：上游载体重叠区域+酶切位点 (可选) +正向特异性引物扩增序列

R 反向引物 (5' -3')：下游载体重叠区域+酶切位点 (可选) +反向特异性引物扩增序列

注意 1：

- 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. 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；
- c. 计算扩增引物 Tm 值时，只需计算特异性引物的 Tm 值，引入的额外序列无需计算。

注意 2：

插入多个片段时引物设计：第一片段的上游引物和第三片段的下游引物，分别按照单片段插入的方式引入载体两端的同源序列即可；片段间同源序列引物设计有三种方式：

- a. 以前一片段 3' 端 15~25 nt 作为同源序列添加至后一片段 5' 端(如示例二图所示)；
- b. 以后一片段 5' 端 15~25 nt 作为同源序列添加至前一片段 3' 端；
- c. 两片段各取一部分作为同源序列(总计 15~25 nt)，分别添加至另一片段末端。

4. 插入片段的 PCR 扩增

推荐使用高保真 PCR Mix 进行扩增，以减少扩增突变的引入。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，可直接使用，但加样体积不应超过总反应体积的 20%。

5. 重组反应 (推荐 10 μL 体系)

1) 体系的配制

组分	反应体系	阴性对照 ^③	阴性对照 ^④	阳性对照 (可选) ^⑤
2 \times Uniclone Cloning Mix	5ul	5ul	5ul	5ul
线性化载体 (50~200 ng) ^①	X μL	X μL	0 μL	1 μL (pUC19 Control Plasmid, Linearized)
插入片段 (10~200 ng) ^②	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

①: 最适载体用量 (ng) = 0.02 \times 载体碱基数, 即 0.03 pmol;

②: 最适片段用量 (ng) = 0.04 \times 片段碱基数, 插入多片段, 每片段最适用量 (ng) = 0.02 \times 片段碱基数。若插入单片段的长度大于载体, 则应互换载体与插入片段用量; 若插入片段的长度小于 200 bp, 则插入片段应使用 5 倍载体用量;

③: 检验线性化载体中是否有背景质粒残留;

④: 当插入片段扩增模板是与克隆载体抗性相同的环状质粒时, 推荐进行;

⑤: 用来排除其他操作因素的影响。

注 1: 若按上述公式计算得到的用量超过最低 / 最高值, 则建议直接按最低 / 最高用量使用;

注 2: 载体片段过长、插入片段过长或片段数过多, 克隆阳性率均会降低。

2) 反应条件

将上述各个成分, 用移液枪轻轻吸打混匀各组分, 避免产生气泡, 切勿涡旋。按如下条件进行反应:

插入片段	反应条件
1~2 个插入片段	50°C, 5~15 min
3~5 个插入片段	50°C, 15~30 min

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;

注 1: 推荐使用 PCR 仪等温控比较精准的仪器进行反应, 反应时间不足或太长克隆效率均会降低;

注 2: 50°C 反应完成后, 建议进行瞬时离心, 将反应液收集至管底。

注 3: 将反应管置于冰上冷却, 建议即时转化。(-20°C 储存的重组产物, 建议在 1 周内使用。)

6. 重组产物转化

1) 取 100 μL 冰浴上融化的感受态细胞, 加入适量重组产物 (体积不超过所用感受态细胞体积的 1/10), 轻轻混匀, 冰上静置 25 min;

2) 42°C 水浴热激 45 s, 迅速转移至冰浴中, 静置 2 min;

3) 向离心管中加入 700 μL 不含抗生素的无菌培养基 (2 \times YT 或 LB), 混匀后 37°C, 200 rpm 振荡培养复苏 1 h;

4) 根据实验需要, 吸取不同体积的复苏液均匀涂布到含相应抗生素的 LB 培养基上, 将平板倒置放于 37°C 培养箱过夜培养。

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/ μg 的感受态细胞;

注 2: 菌落数取决于 PCR 产物与线性化载体的数量和纯度;

注 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。

7. 阳性克隆的鉴定

- 1) 菌落/菌液 PCR 鉴定: 用枪头挑取单菌落至 10 μ L 无菌水中混匀后取 1 μ L 为模板, 或直接蘸取菌落至 PCR 体系中扩增 (建议至少使用一条通用引物, 避免假阳性结果);
- 2) 以质粒为模板 PCR 鉴定: 挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中, 37°C, 200 rpm 过夜摇菌后抽提质粒作为模板, 可使用载体通用引物或特异性引物扩增;
- 3) 酶切鉴定 (若有需要): 挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中, 37°C, 200rpm 过夜摇菌后抽提质粒, 使用相应内切酶酶切质粒后电泳检测片段大小;
- 4) 测序: 建议使用载体通用引物测序鉴定。

常见问题

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 片段比例不佳: 按照说明书推荐的最适用量和比例配制反应体系。载体和插入片段的浓度测定: 若线性化载体与插入片段已经过纯化, 且经电泳检测条带单一或无 Smear 残留时, 可使用超微量核酸蛋白检测仪等基于分光光度法的仪器进行浓度测定, 但只有当 A260/A280 在 1.8~2.0 之间时浓度值可信; 若线性化载体与插入片段未经过纯化, 也可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 ddH₂O 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, 提高快速内切酶的使用量, 延长反应时间, 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 等甲基化敏感型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。

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 体系, 提高扩增特异性, 或胶回收纯化 PCR 产物重叠序列的扩增引物。

本产品仅供科研使用。