

One Step Seamless Cloning Kit

货号: DT100-10

规格: 100次

保存: -20°C

【产品简介】

本产品不依赖于T4连接酶,不受载体和目的片段的酶切位点限制,可将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。采用特殊的酶组合可以将经过任意方法线性化的载体和与其两端具有 25-40 bp 重叠区域的 PCR片段定向重组。可以15分钟内实现A末端或者平末端PCR产物片段高效定向无缝克隆至载体的任意位点。产品可用于快速克隆、无缝克隆、高通量克隆、定点突变。

【产品组分】

试剂盒组成	DT100-01	DT100-10
2 × One Step Cloning Mix	50 μl	250 μl*2
Positive Control	10 μl	25 μl*2
Sterile ddH ₂ O	1ml	1ml*2

【保存条件】

-20 °C保存,有效期12个月,避免反复冻融。

【操作步骤】

1. 线性化载体制备:

(1) 选择合适的克隆位点,对载体进行线性化。推荐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 25-40bp 区域内 GC 含量均在 40%-60%之间时,重组效率最高。

(2) 载体线性化方式:可以选择限制性内切酶酶切消化,或反向 PCR 扩增。

酶切制备线性化载体时,推荐使用双酶切方法使载体线性化完全,降低转化背景(假阳性克隆);若使用单酶切线性化,请适当延长酶切时间以减少环状质粒残留,降低转化背景。反向 PCR 扩增制备线性化载体时,建议使用高保真聚合酶。

2. 插入片段获得

(1) 引物设计

设计原则是通过在引物5'端引入同源序列,使扩增产物之间,以及扩增产物与线性化克隆载体之间都具有能够相互同源重组的完全一致的序列(25bp-40bp,不包括酶切位点)。克隆正向引物(5'-3'):线性载体正向25-40 nt 重叠区序列(3'末端算起)+插入片段正向特异引物序列(18-25 nt)克隆反向引物(5'-3'):线性载体反向 25-40 nt 重叠区序列(3'末端算起)+插入片段反向特异引物序列(18-25 nt)注意:重叠区的碱基数至少25bp,并且多段重叠区域之间的Tm值尽量保持一致且>60°C(AT pair=2°C and GC pair=4°C),否则可延长碱基数目直到符合要求。按照线性载体末端的结构(5'突出,3'突出,平末端),引物设计也分3种情况:

A:载体酶切形成5'突出末端

从3'端开始计算,往回算25-40 bp(本举例采用了BamHI, puc57载体和25 bp末端重叠相同序列),加到目的片段特异引物序列前面即可,以上引物设计完成克隆连接后,酶切位点将会消失(不保留酶切位点),如果需要保留酶切位点,需要在载体末端25 bp 重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐5'突出末端的序列,完成克隆连接后,酶切位点依然存在(保留酶切位点)。

5' NNNNN GAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATATCG3' 目标序列(不保留酶切位点)

5' NN GAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATATCGCTAG3' 目标序列(保留酶切位点)

B:载体酶切形成3'突出末端

从3'端开始计算,往回算25-40 bp(本举例采用了KpnI, puc57载体和25 bp末端重叠相同序列),加到目的片段特异引物序列前面即可,以上引物设计完成克隆连接后,酶切位点将会消失,如果需要保留酶切位点,需要在载体末端25 bp 重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐酶切位点的缺失碱基(C),完成克隆连接后,酶切位点依然存在(保留酶切位点)。

5' .NNN GACGTTGTAACGACCGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTAC3' 目标序列(不保留酶切位点)

5' .NN GACGTTGTAACGACCGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTAC3' 目标序列(保留酶切位点)

C:载体酶切形成平末端

从3'端开始计算,往回算25-40bp(本举例采用了EcoR V, puc57载体, 25 bp末端重叠相同序列),加到目的片段特异引物序列前面即可,以上引物设计完成克隆连接后,酶切位点将会消失,如果需要保留酶切位点,需要在载体末端25 bp重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐酶切位点缺失的序列(ATC),完成克隆连接后,酶切位点依然存在(保留酶切位点)。

5' .NNN CAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGAT 3' 目标序列(不保留酶切位点)

5' .NN CAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATATC 3' 目标序列(保留酶切位点)

(2) 多个插入片段的克隆引物设计:与载体两端连接的插入片段引物设计方法与之前一样,其他插入片段保证片段与片段之间有25-40 bp的重叠区即可。

(3) **插入片段 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, 在最终载体中不会出现)。但为了减少扩增突变的引入, 推荐使用高保真聚合酶。

3. 按照下表建立反应体系(可使用 PCR 管在冰上配制, 以10 μ l体系为例)

克隆反应		阳性对照
每个 DNA 片段	0.1 pmol * X μ l	5 μ l Positive Control
线性化载体	0.1 pmol * X μ l	
2 \times One Step Cloning Mix	5 μ l	5 μ l
Sterile ddH ₂ O	Up to 10 μ l	Up to 10 μ l

注: * 阳性对照含载体和 2 个 DNA 片段。

* 若您使用未纯化的 PCR 产物进行重组反应, 未纯化的 DNA 片段的体积不能超过总反应体积的 10%。

* 克隆菌株制备的化学感受态细胞的选择, DH5 α Competent *E. coli* Strain等(常规克隆), 适用于<15 kb 质粒; XL10 Competent *E. coli* Strain (大片段克隆), 适用于>10 kb 质粒。

(1) 轻柔混匀反应物, 在 50 $^{\circ}$ C 反应15分钟(可在PCR仪器上进行)。

(2) 吸取2 μ l 反应液转化大肠杆菌感受态细胞。(推荐使用高效感受态细胞, 即每 μ g pUC19 载体转化后至少能得到>2 \times 10⁸ 转化子)。若需要进行电转, 将反应液稀释5倍, 再吸取 1 μ l 进行转化。

(3) 取 1/10 体积的转化细胞进行涂布, 若克隆目的片段多于3个, 建议对转化后的感受态细胞进行离心后再涂布。对于阳性对照反应, 取 1/10 体积的转化细胞涂布在含 0.1 mM IPTG 的氨苄培养板上。37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

【DNA片段的加入量】

1. 每个反应中单个 DNA 片段的推荐使用量为 0.1 pmol;
2. 当克隆一到两个 DNA 片段时, 推荐片段和载体的摩尔比为 2:1;
3. 当克隆三个以上 DNA 片段时, 推荐片段和载体的摩尔比为 1:1;
4. 当克隆片段小于 200 bp 时, 推荐片段和载体的摩尔比为 5:1。
5. 使用 UV 或荧光检测目的 DNA 片段的浓度, 参考下列公式计算反应中每个 DNA 片段的用量。

$$\mu\text{l of DNA fragment} = \frac{0.65 \times \text{pmol} \times \text{bp}}{\text{ng} / \mu\text{l}}$$

也可以参考下面的表格, 根据片段的长度来粗略估计相应的每个反应中 DNA片段的用量

(例如: 每个反应中加入 0.1 pmol 的 DNA 片段):

DNA 片段大小	每个反应 DNA 加入量
0.5 kb	16 ng
1 kb	34 ng
1.5 kb	50 ng
2 kb	67 ng
3 kb	100 ng
5 kb	165 ng

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时, 本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下, 本公司对此产品所承担的责任, 仅限于此产品的价值本身。