

产品概述

Seamless Cloning Plus Master Mix 是我公司开发的一款简单、快速、高效的通用型无缝克隆产品，可将插入片段快速定向克隆至任意载体的任意位点，在保证克隆数多和阳性率高的同时，一次可实现多至 5 个插入片段的同源重组，同时兼容低 DNA 投入量反应体系，无需对 PCR 扩增产物进行切胶、柱回收等纯化预处理，操作流程大幅简化。Seamless Cloning Plus Master Mix 可应用于快速克隆、高通量克隆、无缝克隆和 DNA 定点突变等领域。

试剂组成

Components	BR1C102-01	BR1C102-02	BR1C102-03
	20 T	40 T	20 T×5
Seamless Cloning Plus Master Mix	0.1 mL	0.2 mL	0.1 mL×5

保存条件

-20±5℃存储。

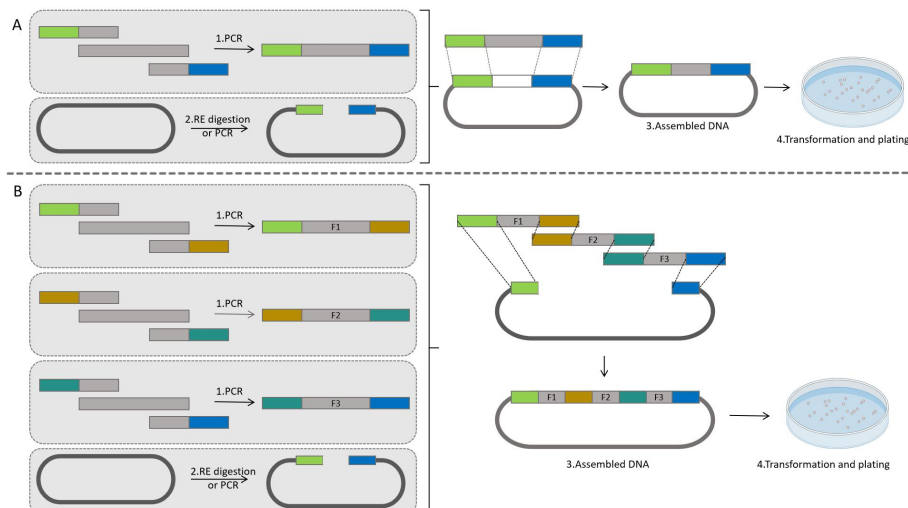
注意事项

1. 本产品仅作科研用途，不用于临床诊断。
2. 使用前应混匀，避免反复冻融。
3. 组装前需要将载体和插入片段线性化，线性化方式可选择酶切或 PCR 扩增，并在载体和插入片段两端设置一段同源序列 (15-25 bp)，使得载体和插入片段 5'和 3'端带有相同的同源序列。同源区域内 GC 含量可控制在 40-60%。
4. 通常调整载体用量 $0.03 \text{ pmol} = [0.02 \times \text{载体碱基对数}] \text{ ng}$ ，插入单片段用量 $0.06 \text{ pmol} = [0.04 \times \text{插入片段碱基对数}] \text{ ng}$ ，插入多片段时，每个片段 $0.03 \text{ pmol} = [0.02 \times \text{插入片段碱基对数}] \text{ ng}$ 。
5. 为确保加样的准确性，在配置同源重组反应体系前可将线性化载体和插入片段适当稀释，各组分加样量不低于 1 μL 。
6. 反应结束后置于冰上，立即转化。若不能及时转化，可置于-20℃保存。

自备材料

1. 片段扩增用 DNA 模板和引物；线性化载体。
2. 高保真聚合酶或其他等效产品。
3. 感受态细胞：克隆菌株制备的化学感受态细胞。
4. 其他材料：ddH₂O、PCR 管、PCR 仪等。

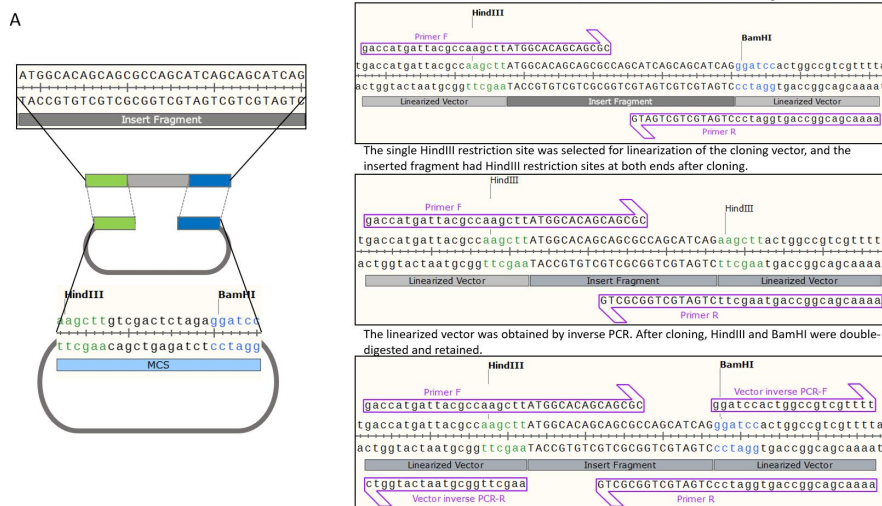
自备材料无缝克隆实验操作流程

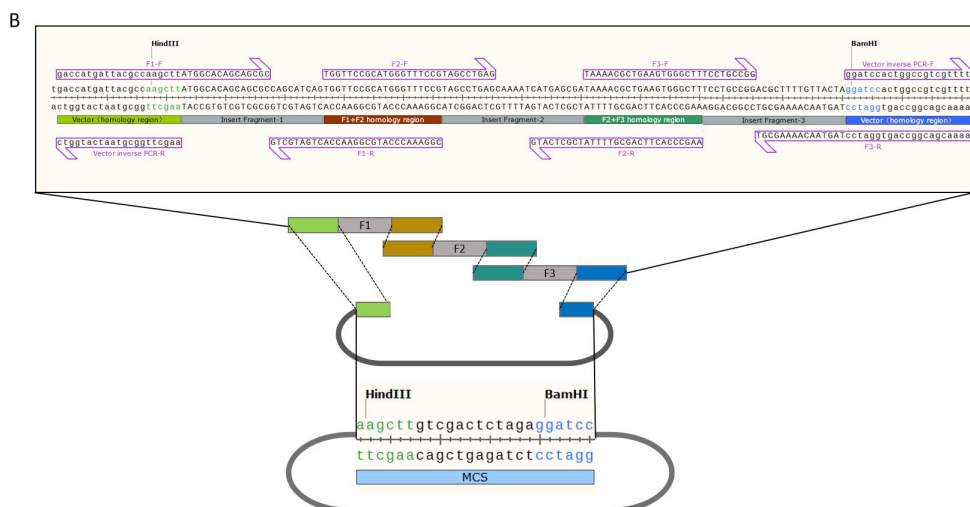


1. PCR 片段扩增: 扩增引物 5' 端需添加 15–20 bp 同源序列 (图中彩色标注区域), 保证线性化载体与插入片段两端均带有 15–20 bp 同源臂。
2. 载体线性化: 环状载体可通过限制性内切酶酶切或反向 PCR 两种方式处理, 获得线性化载体。
3. 同源重组反应: 按适宜摩尔比例混合线性化载体与全部插入片段, 加入无缝克隆反应预混液, 置于 50°C 条件下孵育 5–30 min, 完成同源重组, 实现多段线性 DNA 片段的体外环化。
4. 转化: 重组产物可直接用于感受态细胞转化, 涂布平板后可获得数百个单菌落, 用于后续阳性克隆筛选。

PCR 引物设计方法

在插入片段正向、反向扩增引物的 5' 端与 3' 端, 分别引入线性化载体两端的同源序列; 使扩增得到的插入片段两端, 携带与线性化载体末端完全匹配的同源臂。同源臂长度控制为 15–20 bp, 且同源序列内部不得包含限制性酶切位点。进行多片段同源重组时, 相邻插入片段之间、插入片段与线性化载体之间均需设计 15–20 bp 同源重组区域。插入片段扩增引物推荐退火温度 (T_m 值) 为 60–65°C; 若引物总长度超过 40 个核苷酸, 引物合成阶段建议选用 PAGE 纯化方式。单片段同源重组、多片段同源重组对应的引物设计示意图分别详见图 A、图 B。





实验流程

线性化载体制备

载体的克隆位点上下游 20 bp 应无重复序列，且 GC 含量在 40-60% 之间。

载体的线性化有以下几种方式：

单酶切线性化：单酶切线性化需要适当延长酶切时间，以保证充分酶切，降低转化背景。

双酶切线性化：推荐使用双酶切方法使载体充分酶切，降低转化背景。

反向 PCR 扩增：推荐使用高保真聚合酶扩增载体序列，避免引入突变位点。推荐使用线性化的质粒作为扩增模板，以减少环状质粒模板残留，降低转化背景。

插入片段获得

引物设计可参考上文引物设计原则。插入片段可使用 Taq 酶或高保真酶进行扩增，PCR 产物末端有无 A 尾对同源重组没有影响，A 尾在同源重组过程中会被去除，不会出现在同源重组后的环化载体中。为了避免片段扩增过程中引入突变，推荐使用高保真聚合酶扩增片段。

同源重组反应

线性化载体和插入片段浓度测定：线性化载体和插入片段推荐使用高质量高的胶回收试剂盒（Gel DNA Purification Kit, Biori #BR2A103-01/02）进行胶回收纯化或产物纯化，可通过电泳检测无明显杂带，或使用基于吸光值的仪器进行浓度测定， A_{260}/A_{280} 在 1.8-2.0 之间时浓度可信度较高。当样品浓度低于 10 ng/ μ L 时，不同仪器基于 A_{260} 得到的浓度存在较大差异，建议重新制备样品。

线性化载体和插入片段的用量计算：通常线性化载体的用量是 0.03 pmol，在单片段同源重组体系中，插入片段的用量是 0.06 pmol，而在多片段同源重组体系中，插入片段的用量均为 0.03 pmol，具体的用量可参考下表中的公式粗略计算。

同源重组类型	组分	最适量 (ng)	最适量 (pmol)	摩尔比 (载体: 片段)
单片段同源重组 (载体长度 > 插入片段)	线性化载体	$[0.02 \times \text{载体碱基对数}] \text{ ng}$	0.03 pmol	1: 2
	插入片段	$[0.04 \times \text{片段碱基对数}] \text{ ng}$	0.06 pmol	
单片段同源重组 (载体长度 < 插入片段)	线性化载体	$[0.04 \times \text{载体碱基对数}] \text{ ng}$	0.06 pmol	2: 1
	插入片段	$[0.02 \times \text{片段碱基对数}] \text{ ng}$	0.03 pmol	
多片段同源重组	线性化载体	$[0.02 \times \text{载体碱基对数}] \text{ ng}$	0.03 pmol	1: 1
	插入片段-1	$[0.02 \times \text{片段碱基对数}] \text{ ng}$	0.03 pmol	
	插入片段-2	$[0.02 \times \text{片段碱基对数}] \text{ ng}$	0.03 pmol	
	插入片段-3	$[0.02 \times \text{片段碱基对数}] \text{ ng}$	0.03 pmol	

对于单片段同源重组反应,插入片段的使用量应大于 20 ng。当插入片段长度小于线性化载体长度时,摩尔比(载体:片段)为 1:2;当插入片段长度大于线性化载体长度时,载体和片段的最适用量计算应互换,即摩尔比(载体:片段)为 2:1。当插入片段的 PCR 产物无非特异性扩增条带时,可不进行 DNA 纯化直接使用,推荐同源重组体系中的加样量为 2 μ L,但同源重组的效率会降低,建议纯化后进行重组。

对于多片段同源重组,各插入片段的使用量应大于 10 ng,如果根据上表中的公式计算得出的用量低于 10 ng 时,建议使用 10 ng 即可。

同源重组反应体系配置:建议于冰上配置。

Components	Volume per Reaction
Seamless Cloning Plus Master Mix	5 μ L
Linearized Vector	X μ L
Insert Fragment	Y μ L
ddH ₂ O	To 10 μ L

表格中的 X,Y 分别表示根据公式计算的线性化载体和插入片段的最适用量。为确保加样体积准确,建议对浓度较高的样品进行适当稀释,确保各组分的加样量不低于 1 μ L,从而减少加样误差。

同源重组对照体系:

Components	阴性对照-1	阴性对照-2
Seamless Cloning Plus Master Mix	0 μ L	0 μ L
Linearized Vector	X μ L	0 μ L
Insert Fragment	0 μ L	Y μ L
ddH ₂ O	To 10 μ L	To 10 μ L

阴性对照-1 可以检测线性化的载体中是否有环状质粒残留,如果阴性对照-1 体系转化后有单菌落,则说明有环状质粒残留,从而可以判断载体双酶切或者单酶切是否彻底,或反向 PCR 扩增体系内的环状质粒模板是否存在。

阴性对照-2: 如果插入片段的扩增模板是环状质粒且于线性化载体抗性相同时,该对照体系可检测插入片段样品中是否有环状质粒残留,如果阴性对照-2 体系转化后有单菌落,则说明有环状质粒残留。

同源重组体系反应条件:

同源重组片段个数	常规反应条件	可选优化范围
1	50°C, 30 min	50°C, 5-30 min
2-3	50°C, 30 min	50°C, 15-30 min
4-5	50°C, 30 min	50°C, 30 min

反应结束后降温至 4°C 或置于冰上,立即转化。若不能及时转化,可置于 -20°C 保存 1 周。

推荐使用 PCR 仪等温控精确的仪器进行反应。

同源重组片段个数较少时可适当减少反应时间,同源重组片段个数较多时,反应时间 30 min,注意反应时间不超过 30 min。5-30 min 内随着反应时间的延长,平板菌落个数相应增加。

同源重组产物转化

1. 将感受态细胞至于冰上解冻。

2. 取 5-10 μ L 重组产物加入到 100 μ L 的感受态细胞中,轻弹管壁混匀(请勿剧烈震荡),冰上静置 30 min(部分感受态细胞只需冰浴 25 min)。重组产物转化体积不应超过感受态细胞体积的 1/10。

3.42°C水浴热激 30 sec (具体热激时间因感受态细胞种类不同有所差异, 具体以感受态细胞说明书提供的热激时间为准), 立即置于冰上冰浴 2-3 min。

4.加入 900 μ L 无抗 LB 液体培养基, 37°C, 200-250 rpm 摇菌 1 h。

5.5000 rpm 离心 5 min, 于超净台中弃 900 μ L 上清, 剩余培养基重悬离心后的菌体, 涂布在载体对应抗性的 LB 固体平板, 于 37°C培养箱中倒置培养 12-16 h。

阳性克隆鉴定

菌落 PCR: 挑单克隆至 10 μ L 无菌纯水中作为扩增模板, 使用合适的正反向引物进行扩增, 建议至少 1 条引物是载体上的引物。

酶切鉴定: 挑取单克隆至含抗性的 LB 液体培养基中过夜培养并提取质粒, 选择载体上合适的双酶切位点进行酶切, 电泳检测酶切后的片段大小是否和理论相符, 从而判断阳性克隆。

测序鉴定: 挑取单克隆至含抗性的 LB 液体培养基中进行培养, 可选择菌液或者菌液提取的质粒样品送测序, 建议至少 1 条测序引物是载体上的, 将测序结果和理论序列进行比对, 从而判断阳性克隆。同时可检查构建过程中是否引入突变。

常见问题与解决方案

平板上无转化子或数量很少

- 1.引物设计不正确: 引物应包含 15-25 bp 同源臂, GC 含量在 40-60%之间。
- 2.组装体系比例不合适: 按照说明书推荐用量进行配置, 线性载体和片段加入过多或过少均会对重组效果有影响。
- 3.线性载体和片段不纯: 核酸纯度过低或纯度低会影响重组效果, 可提高线性载体和片段浓度。
- 4.感受态细胞转化效率低: 感受态细胞转化效率应大于 10^7 cfu/ μ g。

多数克隆不含插入片段或含有不正确的插入片段

- 1.PCR 产物含有非特异性扩增产物: 优化 PCR 扩增体系, 提高特异性; 胶回收 PCR 扩增产物, 回收单一片段; 对更多转化子进行鉴定。
- 2.扩增模板处理不彻底: 转化时设置阴性对照, 验证酶切或扩增产物是否线性化完全; 优化酶切体系, 增加酶切酶用量或酶切时间。

菌落 PCR 鉴定无条带

- 1.引物不正确: 推荐使用载体的通用引物进行检测, 或者至少 1 条引物是载体通用引物。
- 2.PCR 体系或程序不合适: 优化 PCR 扩增体系。优化程序, 关注引物 T_m 值, 选择合适的退火温度和时间。
- 3.更换其他鉴定方式: 例如质粒双酶切鉴定。
- 4.重组失败: 建议做阴性对照-1 体系, 判断载体线性化是否完全。