



## 一步法无缝单/多片段克隆 mix (5x, 高浓缩版)

### One Step Seamless Assembly and Cloning mix (5x)

产品货号：C06-01034

产品规格：10T(20ul) / 4x10T

储存条件：长期保存，请置于-20°C，有效期6个月。使用后请及时放入-20°C保存以保证酶的活性。

**温馨提示：**引物合成公司生产的引物默认没有5'-磷酸基团，因而无法直接相连。做多片段无缝克隆，请务必合成带有5'-磷酸的引物，或者对PCR产物用磷酸激酶处理，使之可以在连接酶作用下形成完整载体。

#### 产品简介：

本产品不依赖于T4 DNA连接酶，不受载体和目的片段的酶切位点限制，而直接用重叠片段重组的方法，采用特殊的酶组合可以将任意方法线性化后的载体和与其两端具有15-25bp重叠区域的PCR片段定向重组，可以快速实现1-5个片段的高效无缝克隆。本产品采用5x高浓缩形式，使得反应体系中能加入更多目的片段和载体，从而提高连接效率，特别适合一些高难度的拼接反应。

#### 产品特点：

- 30分钟可以将一个或者多个长、短PCR扩增片段（平末端或者A粘性末端）插入载体。
- 不受载体和插入片段酶切位点的可用性和平端/粘性末端的限制，可以在任意位点进行克隆。
- 无缝克隆，插入点不会引入不需要的碱基序列。
- 高效、准确，阳性率>95%。

#### 操作步骤：

**注意：**本产品含有连接增强剂很粘稠，从冰箱拿出来温度低时更粘稠，可以放在手心化冻几分钟提高温度便可降低粘稠度（不影响质量），轻弹混匀，瞬间离心收集到管底。

- 按照下表建立反应体系（可使用PCR管在室温操作）

Linear Vector (10-80ng)*	X $\mu$ l
Linear Insert**	Y $\mu$ l
M5 Compact Seamless Assembly and Cloning mix (5x)	2 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O 补足至（尽量多加片段和载体，少加水！）	10 $\mu$ l

注意：必须通过DNA电泳对比条带亮度进行定量，仅靠OD值是不够的（因为某些时候OD值可能虚高）。

\* 载体一般用20-50 ng。

\*\* 插入片段与载体的摩尔比在2:1-3:1之间最佳；如果插入片段小于200bp，插入片段与载体的摩尔比用5:1。

**多片段同源重组反应最适DNA使用量为：载体与各个插入片段摩尔比为1:1。**

- 轻轻混匀，在37°C（如果同源臂GC含量高，可以提高到50-55°C）反应15-30分钟（可在PCR仪器上进行），反应结束后，将PCR管置冰上，直接转化或者保存于-20°C。较短片段例如100bp-1kb只需要15分钟便能获得足够转化子，较长片段的连接，可以延长反应时间到60分钟。
- 取5 $\mu$ l反应产物按照感受态细胞说明书进行转化。重组产物加入的量不要超过感受态体积的1/10，比如5 $\mu$ l反应物加入至少50 $\mu$ l感受态细胞中，如果转化子较少，可以将所有的产物转化并将所有的转化液涂板。
- 可根据具体情况，选择菌落PCR鉴定，提取质粒进行限制性内切酶鉴定或测序鉴定。

线性化载体和插入DNA片段的制备：

## A、线性化载体的制备

1). 酶切来源：酶切所得线性载体，平末端或者粘端、单酶切或者双酶切均可，酶切后胶回收。

注意：一步法无缝克隆反应体系内无 DNA 连接酶，不会发生载体自连反应。因此，即使是以单酶切方式制备的线性化载体也无需进行末端脱磷酸处理。重组产物转化后出现的假阳性克隆（无插入片段）是由酶切不完全未线性化环状载体转化而形成的。我们推荐酶切后胶回收可以把这种未线性化载体比例降低到最低程度。

2). PCR 来源：建议使用高保真 DNA 聚合酶或者 mix 制备，如果扩增条单一可以通过 PCR 产物纯化或者胶回收获得载体。

注意：PCR 的质粒模板也是非线性化载体，也可能导致假阳性克隆（无插入片段），因此 PCR 来源线性载体（PCR 产物）纯化前用 Dpn I 内切酶消化质粒模板，可以降低背景，提高阳性率。但是一般情况下，经过胶回收已经足以把这种未线性化载体比例降低到最低，因此反向 PCR 来源的线性化载体我们也推荐胶回收。

## B、插入 DNA 片段的制备

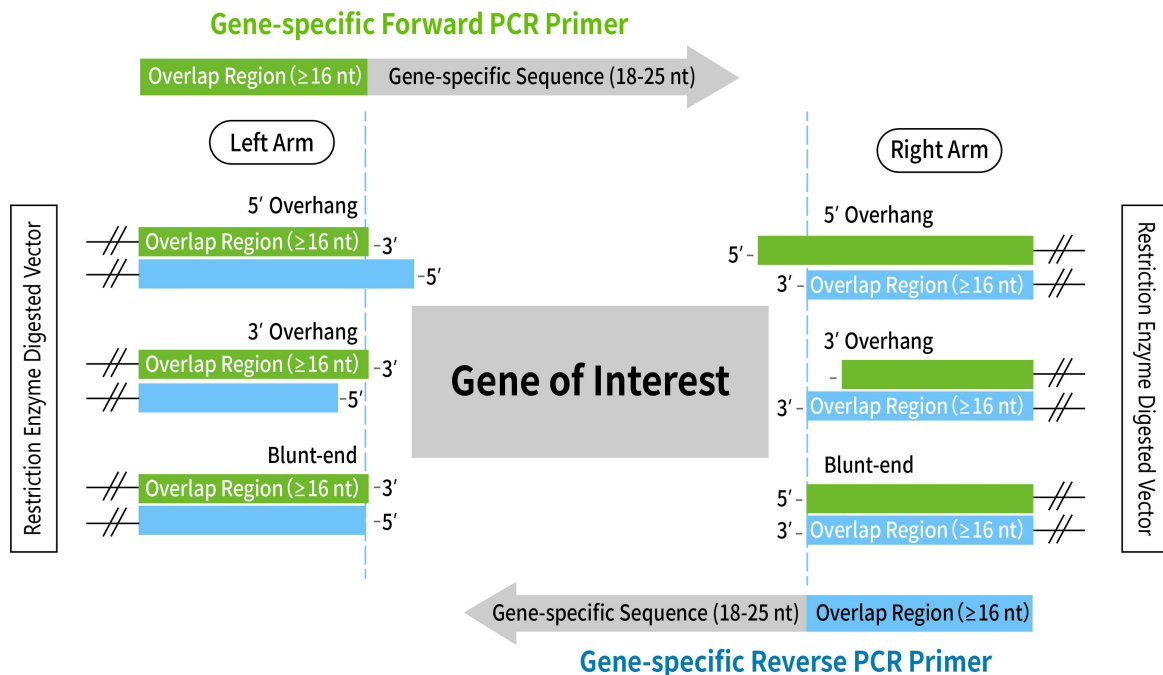
1). 插入片段引物设计：克隆引物包括插入片段特异性引物序列和重叠序列。

克隆正向引物（5'-3'）：线性载体正向 $\geq 16$  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 $\geq 16$  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 16 bp，并且 Tm 值要  $> 48^{\circ}\text{C}$ （AT pair =  $2^{\circ}\text{C}$  and GC pair =  $4^{\circ}\text{C}$ ），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，示意如下：



线性化载体的两端因线性方式（如单酶切、双酶切、反向 PCR）不同，可以是以上三种末端结构的两两任意组合，插入片段特异性引物设计的原则遵循一般引物设计的原则即可。计算扩增引物退火温度时，只需计算基因特异性扩增序列的 Tm 值，载体末端同源序列不应参与计算。

正向引物设计举例说明（EcoRI 酶切开）：



如上图，载体由 EcoRI 酶切开，形成 5'突出末端：

根据上述设计原则，从 3'端开始计算，往回算 16bp-20bp（本举例采用了 16bp 末端重叠相同序列），加到目的片段特异引物序列前面即可。正向引物具体如下：5'- GCT AGC GAA TTG GCC G NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

注意：以上引物设计完成克隆连接后，EcoRI 酶切位点将会消失（不保留酶切位点）。

如果需要保留 EcoRI 酶切位点，需要在载体末端 16bp 重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐缺失的 EcoRI 识别位点序列 aattc，完成克隆连接后，EcoRI 酶切位点依然存在（保留酶切位点）。

具体如下：5'- GCT AGC GAA TTG GCC G aattc NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -3'

反向引物设计举例说明（HindIII 酶切开）：



如上图，载体由 HindIII 酶切开，形成 5' 突出末端：

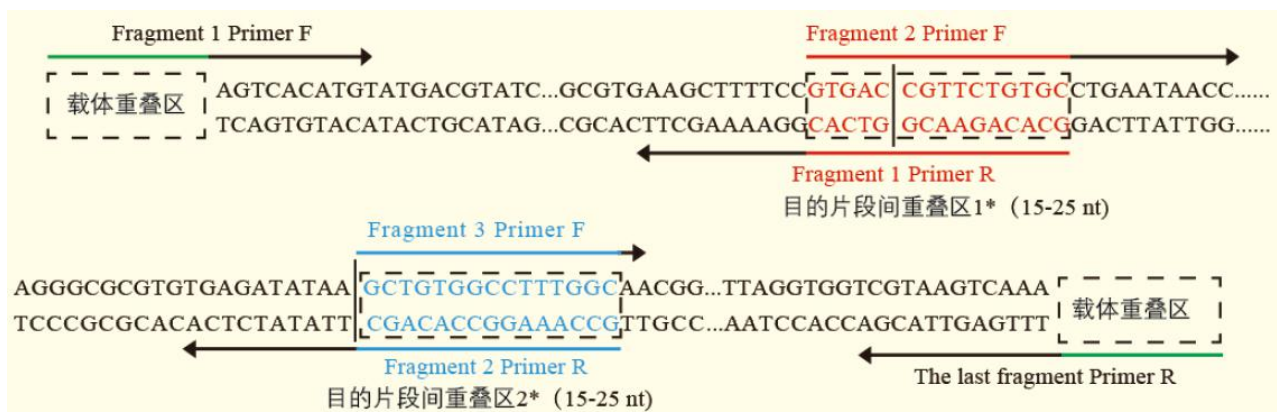
根据上述设计原则，从 3' 端开始计算，往回算 16bp-20bp（本举例采用了 16bp 末端重叠相同序列），加到目的片段特异引物序列前面即可。反向引物具体如下：5'- CAT CGG ATC GTT CGC A NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -3'

注意：以上引物设计完成克隆连接后，HindIII 切位点将会消失（不保留酶切位点）。

如果需要保留 HindIII 酶切位点，需要在载体末端 16bp 重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐缺失的 HindIII 识别位点序列 agctt，Hind III 酶切位点依然存在（保留酶切位点）。

具体如下：5'- CAT CGG ATC GTT CGC A agctt NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -3'

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同单片段设计方法，片段与片段之间连接的插入片段引物设计方法见下图：



\* 多个插入片段之间重叠区设计有上述\*标记(蓝色和红色)的两种方式，在多片段引物设计时，选择任意一种方式或者两种方式混用均可，保证片段与片段之间有 15-25bp 的重叠区。

3). 酶的选择：建议使用高保真 DNA 聚合酶或者 mix。

4). 反应条件：一般按照具体使用的高保真聚合酶说明书进行即可。

5). 纯化插入片段（视如下几种情况选择回收方法）：

a) 片段来源于质粒模板，且该质粒与重组载体具有相同抗性，纯化前用 Dpn I 内切酶消化质粒模板，可降低背景提高阳性率。

b) 片段来自 PCR 产物，且 PCR 结果单一，则建议用 PCR 产物纯化试剂盒纯化片段。

c) PCR 有非特异扩增，则建议切胶回收，用胶回收试剂盒回收片段。

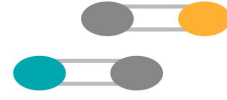
注意：使用该方法克隆，用来线性化载体的酶切位点在拼接的时候会缺失，如果对酶切位点有严格要求的，建议注意酶切位点的选择，必要时可在正反向克隆引物的重叠区序列和特异基因序列之间增加缺失掉的碱基来恢复原有酶切位点（见前述正反向引物设计举例说明）。如果重组质粒用于蛋白表达，则在引物设计时注意读码框，蛋白表达及纯化所需序列（如启动子，RBS 序列，起始密码子，终止密码子，蛋白标签等）不被破坏。

原理示意图：

1. PCR或酶切方法制备线性化载体

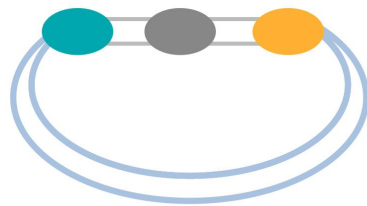
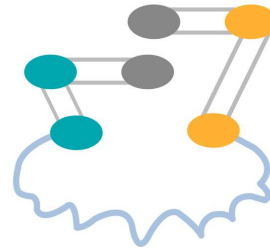
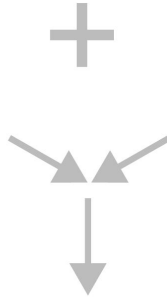


2. 用含重叠末端的引物扩增插入DNA片段。  
(可连接1-5个片段,本示意图为2个)



3. 加入载体、片段、CLoning Master Mix混均, 37°C反应30分钟

插入片段和载体之间、插入片段之间重叠末端进行无缝重组连接(相同颜色代表重叠末端序列)



4. 反应产物直接转化感受态细胞

