

Trelief® SoSoo Cloning Kit

■ 目录号

TSV-S1

■ 产品简介

SoSoo重组克隆试剂盒利用同源重组的原理,可快速将1-5个片段定向克隆到任意方式线性化的载体中。本试剂盒含有的2×SoSoo Mix可将单个或多个片段定向重组至载体中,克服了酶切位点的限制,产物可直接转化感受态细胞。重组反应可在恒温条件下快速进行(50°C处理15 min),数小时内即可完成从DNA样品准备到重组产物的转化涂板培养的全部操作。其工作原理如下:

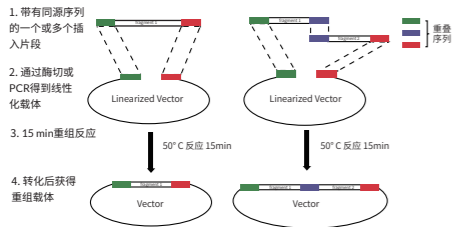


图1 SoSoo重组克隆试剂盒原理图

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ 产品组成

组分	规格
2×SoSoo Mix	100 μL
Control Vector (5 ng/μL)*	10 μL
Control Template (10 ng/μL)**	10 μL

* 线性化质粒,抗性为Amp,含M13F/R序列。

** 阳性对照片段,大小为1,000 bp。

■ 产品应用

- 无缝克隆
- 定点突变
- 高通量克隆

■ 产品特点

- 快速:重组反应仅需要15 min;
- 简单:不受片段酶切位点的影响,无需对片段酶切;
- 高效:阳性率可达95%以上;
- 无缝:不引入额外的序列。

■ 使用方法

1. 制备线性化载体

1) 选择合适的克隆位点

请选择无重复序列且克隆位点上下游25 bp区域内GC含量在40%~60%之间的位点进行克隆。

2) 载体线性化方式

可使用限制性内切酶酶切消化或者反向PCR扩增得到线性化载体。

a. 使用双酶切或单酶切均可,但务必保证酶切完全,以降低转化背景造成的假阳性结果。

b. 使用反向PCR制备线性化载体时,推荐使用高保真聚合酶I-5™ 2×High Fidelity Master Mix (目录号:TPO01)进行扩增。

c. 使用反向PCR制备线性化载体时,为防止环状载体残留造成的假阳性背景高、连接失败等现象,可使用Dpn I酶处理扩增产物。

3) 载体纯化

线性化的克隆载体务必进行凝胶纯化(推荐使用擎科DNA凝胶回收试剂盒,目录号:TSP601)并电泳检测其质量和浓度。

如:大小为4 kb的插入片段上样2 μL。同时使用擎科1 kb DNA Ladder分别上样1 μL、2 μL、3 μL和4 μL,条带大小如图谱所示,其中1,500 bp和4,000 bp为指示带,浓度为20 ng/μL,其余条带均为8 ng/μL。对比可知,2 μL插入片段的亮度与2 μL Ladder的4,000 bp条带亮度相似,所以插入片段的浓度大约为40 ng/2 μL=20 ng/μL。

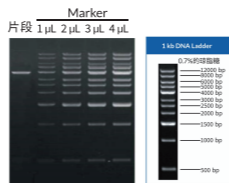


图2 琼脂糖凝胶电泳检测片段浓度

2. 插入片段扩增引物设计

插入片段扩增引物由两部分构成:重叠区域+特异性引物

正向引物(5'-3'):待重组载体正向15~25 nt重叠区域+正向特异性扩增引物序列

反向引物(5'-3'):待重组载体反向15~25 nt重叠区域+反向特异性扩增引物序列

注意:确保重叠区域之间的Tm值一致且>60°C(A-T pair=2°C,G-C pair=4°C),特异性引物依据一般PCR引物的要求设计即可。

在PCR程序中设置扩增引物的退火温度时,只需计算目的片段特异性引物的Tm值,额外引入的酶切位点和重叠区域不计入Tm值。

1) 单片段克隆引物设计

目的片段特异性扩增引物如下:

F:5'-TCACCTGTGGGATATCCGGTG-3'

R:5'-CGCATAAGCGAATGTTCGAAG-3'

a. 以Hind III单酶切线性化载体为例设计克隆引物

从载体序列上选取重叠区域(红色部分):

5'-...ACGTTGTAAACACGACGGCCAGTACGCTTCTTGGCGTAATCATGTATACAG...-3'

3'-...TGCAACATTTTGTGCGCGTCAATTCGAAGAACCAGTACAGTATC...-5'

片段克隆引物如下:

F:5'-TAAACGACGGCCAGTAAGCTTTCACCTGTGGGATATCCGGTG-3'

R:5'-CCATGATTACGCCAAGAAGCTTCGCATAAGCGAATGTTCGAAG-3'

b. 以Sac I/Bam HI双酶切线性化载体为例设计克隆引物

从载体序列上选取重叠区域(红色部分):

5'-...GCTCGAGCACCCAGCGCCGAGCTTCATCCGTTACATCGTATAACGTTAC...-3'

3'-...CGAGCTCGTGGTCCCGGCTTCGAGCCTAGC...-5'

片段克隆引物如下:

F:5'-CCACGGCCGACAGCTTCACCTGTGGGATATCCGGTG-3'

R:5'-ACGTTATACGATGTAACGGATCCCGCATAAGCGAATGTTCGAG-3'

c. 以反向PCR线性化的载体为例设计克隆引物

载体扩增反向引物作为重叠区域(红色部分):

5'-...ATTTCACACAGGAAACAGCTATGAC ACTGCCGTCGTTTACACAAATCA...-3'

3'-...TAAAGTGTGTCTTTGTGATACTG TGACCGGACGCAAAATGTGTAGTT...-5'

片段克隆引物如下:

F:5'-ACACAGGAAACAGCTATGACTCACCTGTGGGATATCCGGTG-3'

R:5'-TGTGTAACACGACGGCCAGTCCGATAAGCGAATGTTCGAG-3'

2) 多片段克隆引物设计

载体两端的引物设计原则与单片段克隆时的设计原则相同,片段之间重叠区域引物设计原则如下,Fragment 1的反向引物和Fragment 2的正向引物有15~25 bp的重叠区域,Fragment 1的反向引物包括重叠区域和反向的特异性引物区域,依此类推(红色为重叠区域)。为了提高克隆效率,可增加片段之间的重叠区域并保证其Tm值一致。



3. 插入片段准备

用上述设计好的克隆引物扩增目的基因片段,推荐使用高保真酶(目录号:TPO01),扩增产物连接之前必须进行凝胶纯化(推荐使用擎科DNA凝胶回收试剂盒,目录号:TSP601)并电泳检测其质量和浓度。

03

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

04

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

05

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

4. 配制反应体系:推荐10 μL体系

组分	用量
线性化载体	X μL
插入片段1	Y1 μL
………	………
插入片段n	Yn μL
2×SoSoo Mix	5 μL
ddH ₂ O	Up to 10 μL

阳性对照连接体系如下

组分	用量
Control Vector (5 ng/μL)	2 μL
Control Template (10 ng/μL)	3 μL
2×SoSoo Mix	5 μL

用移液器轻轻吹打混匀,低速瞬时离心所有液体至离心管底部。载体用量10~100 ng。载体与插入片段的摩尔比为1:2~1:10。多片段连接时各片段之间摩尔比为1:1。

$\text{pmols} = (\text{质量ng} \times 1000) / (\text{片段长度bp} \times 650 \text{ daltons})$

如:

100 ng的2,000 bp片段的摩尔量为 $(100 \times 1000) / (2000 \times 650)$, 约等于0.08 pmols;

100 ng的4,000 bp片段的摩尔量为 $(100 \times 1000) / (4000 \times 650)$, 约等于0.04 pmols;

实际案例:

将20 ng/μL长度为5 kb的线性化载体与100 ng/μL长度为2 kb的插入片段,以摩尔比1:5进行连接,载体与片段的体积比计算为: $[(20 \times V_{\text{载}} \times 1000) / (5000 \times 650)] : [(100 \times V_{\text{片}} \times 1000) / (2000 \times 650)] = 1:5$,即 $V_{\text{载}}:V_{\text{片}} = 2.5:1$ 。

推荐10 μL体系中加入2.5 μL线性化载体(即载体用量为20 ng/μL×2.5 μL=50 ng),1 μL插入片段,5 μL 2×SoSoo Mix和1.5 μL ddH₂O进行实验。

注:所需加入的载体或片段体积较大时,可加大反应体系,保证最终体系中SoSoo Mix浓度为1×即可。

5. 片段重组

体系配置完成后,50°C反应15 min。对于多片段或长片段克隆,可延长反应时间,但最长不要超过60 min。

6. 转化

1) 取100 μL冰浴上融化的感受态细胞,加入目的DNA(质粒或重组产物),轻轻混匀,冰上静置25 min。

2) 42°C水浴热激45~60 s,迅速转移至冰浴中,静置2 min(晃动会降低转化效率)。

3) 向离心管中加入700 μL不含抗生素的无菌液体培养基(SOB或LB),混匀后37°C,200 rpm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SOB或LB培养基上,将平板倒置放于37°C培养箱过夜培养。

7. 阳性克隆鉴定

1) PCR鉴定

2) 酶切鉴定

3) 测序

■ 注意事项

· 重叠区域的Tm值尽量一致且>60°C;

· 线性化载体和片段PCR产物必须凝胶纯化,常用的分光光度法极易受DNA纯度、DNA稀释液pH等因素影响,测定值和DNA实际浓度往往偏差较大,推荐纯化后通过琼脂糖凝胶电泳检测其质量和浓度;

· 控制好载体和片段的用量及摩尔比,线性化载体用量在10~100 ng之间,载体和插入片段摩尔比1:2~1:10均可,多片段连接时各片段摩尔比为1:1;

· 加样完成后,吹打混匀,低速瞬时离心使所有溶液至离心管底部,重组产物即连即转;

· 建议每次实验,做阳性片段和阳性质粒的对照。

■ 常见问题及解决方案

Q1. 不长菌落或菌落极少?

1) 感受态效率低

使用新制备或妥善冻存的感受态细胞,确保转化效率 $>10^7$ cfu/μg。每次可设置一组转化质粒的对照实验,以检测感受态细胞的转化效率。

2) 线性化克隆载体和插入片段扩增产物的用量不足或过量,或者比例不佳

3) PCR产物未纯化或紫外照射时间过长

在365 nm长波紫外下切胶纯化,短波紫外会损伤DNA。

4) 线性载体和插入片段不纯,抑制反应

实验证明连接体系中EDTA、胍盐等会显著降低重组效率,可再次纯化去除盐分的干扰。DNA纯化产物推荐溶解保存在ddH₂O中。

5) 平板抗生素使用错误或浓度过高

核查平板抗性以及浓度是否正确。

Q2. 多数克隆不含插入片段?

1) 克隆载体线性化不完全

痕量未完全酶切的载体即可产生很高的转化背景。提高限制性内切酶使用量、延长酶切反应时间、凝胶回收纯化酶切产物,均可有效减少甚至消除环状质粒残留造成的背景。

2) 反应体系中混入了相同抗性的质粒

PCR扩增模板(扩增克隆载体或者扩增插入片段)为环状质粒。当扩增产物直接用于重组反应时,残留环状质粒模板会产生较高的转化背景。尽量使用预线性化质粒作为扩增模板、扩增产物进行Dpn I 消化、扩增产物进行凝胶回收纯化,均可有效减少甚至消除环状质粒残留造成的背景。

Q3. 克隆含有不正确的插入片段?

1) PCR产物混有非特异扩增产物

优化PCR体系,提高特异性;凝胶回收PCR产物。

2) 载体线性化不完全

线性化载体不是由空载体酶切或扩增制备,而是由已插入其他不同片段的载体酶切或扩增制备而成,不完全酶切或残留环状模板质粒将导致很高的转化背景,使部分克隆中含有不正确的插入片段。提高酶切效率、使用预线性化质粒作为扩增模板、扩增产物进行Dpn I 消化、扩增产物进行凝胶回收纯化,均可以有效避免此类情况发生。

Q4. 菌落或菌液PCR验证无目的条带?

1) 若既没有目的条带,也没有空质粒条带,则说明PCR程序或者体系不合适,建议优化PCR条件后重新实验(推荐使用擎科2×T5 Super PCR Mix (Colony),目录号:TSE005);可考虑提取质粒为模板进行PCR验证或者酶切鉴定;

2) 若无目的条带,但有空质粒条带,则说明重组失败,可能是载体线性化不完全或原始质粒消化不完全造成,建议优化线性化步骤或使用Dpn I 消化原始质粒后,重新实验。

Q5. 菌液PCR正确,但测序结果无信号?

建议使用载体的通用引物,或者至少使用一条通用引物进行菌液PCR,避免特异性引物造成的假阳性结果。

■ 保存条件

-25~-15°C保存1年。

■ 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议,欢迎随时与我们联系:

product@tsingke.com.cn。

