

Trelief® Seamless Cloning Kit

■ 目录号

TSV-S3
TSV0201

■ 产品简介

Trelief® Seamless Cloning Kit利用同源重组的原理,可将1-5个片段定向重组至载体中,可有效克隆50 bp~20 kb的片段到线性化载体中。将载体通过酶切或PCR线性化,并在扩增片段正、反向PCR引物5'端引入15~25 nt同源序列,使得扩增产物之间以及扩增产物与线性化载体之间各有一段同源序列,各片段和线性化载体在重组酶的作用下,仅需50 °C反应15~45 min即可进行转化,克隆阳性率可达95%以上。其工作原理如下:

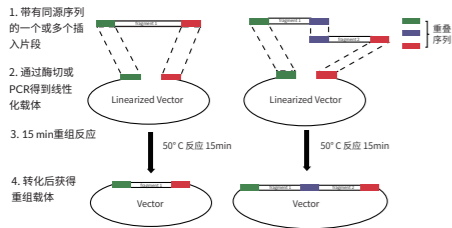


图1 试剂盒原理图

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ 产品组成

组分	TSV-S3 20次	TSV0201 100次
2×Seamless Cloning Mix	100 μL	500 μL
Control Vector (5 ng/μL)*	10 μL	10 μL
Control Template (10 ng/μL)**	10 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:重组反应仅需需要15~45 min;
- 多片段克隆:线性化载体可有效组装1-5个片段;
- 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. 制备线性化克隆载体

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。

02

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

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。

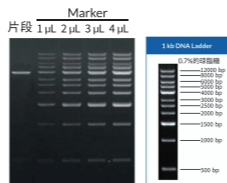


图2 琼脂糖凝胶电泳检测片段浓度

03

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

2. 插入片段扩增引物设计

载体之间各有一段同源序列。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'-...ACGTTGTAAACGACGGCCAGTAGCTTCTTGGCGTAATCATGTATCATAG...-3'

3'-...TGCAACATTTTGTGTCGGCTCATTCGAAGAACCAGCATTAGTACCAGTATC...-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'-...GCTCGAGCACCCGCGCCGAGCTTTCATCCGTTCATCGTATAACGTTAC...-3'

3'-...CGAGCTCGTGGTCCCGGCTTCGAGCCTTCTAGTCAATGTAGCATATTGCAATG...-5'

片段克隆引物如下:

F:5'-CCACGGCCGACAGCTCTCACCTGTGGGATATCCGGTG-3'

R:5'-ACGTTATACGATGTAACGGATCCCGCATAAGCGAATGTTCGAG-3'

04

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

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'-...ATTTACACAGGAAACAGCTATGAC ACTGCCGTCGTTTACACAAATCA...-3'

3'-...TAAAGTGTGTCCTTTGTGATACTG TGACCGGACGCAAAATGTGTAGTT...-5'

片段克隆引物如下:

F:5'-ACACAGGAAACAGCTATGACTCACCTGTGGGATATCCGGTG-3'

R:5'-TGTGTAACGACGGCCAGTCGCATAAGCGAATGTTCGAG-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,推荐使用高保真聚合酶I-5™ 2×High Fidelity Master Mix (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。

05

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

若目的片段以质粒为模板扩增获得,为防止产生空载体背景,建议用Dpn I消化,去除模板质粒。消化完成后,80°C失活Dpn I后再用于重组实验。

4. 载体片段比例:推荐10 μL体系

载体和片段摩尔比为1:2~1:5,多片段重组时,各片段摩尔比为1:1。

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×Seamless Cloning Mix	5 μL
ddH ₂ O	Up to 10 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。摩尔量N=(质量ng×1000)/(片段长度bp×650 daltons)如:

100 ng的2,000 bp片段的摩尔量为(100×1000)/(2000×650)≈0.08 pmol;

100 ng的4,000 bp片段的摩尔量为(100×1000)/(4000×650)≈0.04 pmol。

5. 重组反应

体系配制完成后,混匀各组分,短暂离心将反应液收集至管底。重组1~2个片段,50°C反应15~30 min。重组3~5个片段,50°C反应30~45 min。需在PCR仪或水浴锅等温度精确的仪器上进行。

6. 重组产物转化、涂板

1) 在冰上解冻克隆感受态细胞。

2) 取5~10 μL冷却重组产物,加入到100 μL感受态细胞中,轻弹管壁数下混匀,在冰上放置15~30 min。

3) 42°C热激45~90 s,迅速冰浴2~5 min。

4) 加入约500 μL无抗LB培养基,37°C,200 rpm震荡培养30~60 min。

5) 取适当体积菌液均匀涂布在相应抗生素的平板上,平板倒置于37°C培养箱过夜培养。

■ 注意事项

· 载体需要进行充分酶切后使用,否则未切开的载体会影响后续的阳性克隆鉴定。

· 一般情况下,多片段重组效率低于单片段重组,为保证效率,建议切胶纯化后再进行重组反应。

· 单片段和线性化载体重组时,摩尔比通常为2:1。多片段和线性化载体重组时,各个片段的摩尔数宜保持一致。

· 配制重组体系时,应先加线性化载体、片段和水,最后加2×Seamless Cloning Mix,体系配制最好在冰上,配制完后应立即用于重组反应。

■ 常见问题及解决方案

Q1. 与传统克隆方法相比,此方法有哪些优势?

2×Seamless Cloning Kit可将1~5个DNA片段一次性组装到线性化载体上,克隆片段无酶切位点限制。构建载体速度快于普通酶切连接,克隆效率高于普通酶切连接。

Q2. 可以组装多大的片段?

已用于将12 kb DNA片段成功克隆到30 kb载体中,重组质粒约42 kb。

Q3. 在一次反应中可以组装多少个片段?

在一个反应中组装的DNA片段的数量取决于片段的长度和序列。Trelief® Seamless Cloning Kit已成功将5个3 kb左右的片段装成一个完整的质粒,并且已经过相关实验验证。

Q4. 此方法可以使用的同源臂是多长?

一般使用15-25 nt长度的同源臂,实际长度与同源臂Tm值相关,通常上、下游需一致且大于60°C(A-T pair=2°C,G-C pair=4°C)。

Q5. 可以孵育更长或者更短的时间吗?

线性化载体组装1~2个片段,推荐50°C孵育15~30 min,组装3~5个片段,推荐50°C孵育30~45 min。对于最终组装载体大于10 kb,建议孵育时间再多15 min。

■ 应用实例

1. 单片段重组

将2 kb目的片段Seg1连入5 kb的pET28a载体中,载体使用BamHI单酶切,载体与片段的摩尔比 $N_{\text{载}}:N_{\text{seg1}}=1:5$ 。

1) 计算连接体系

经检测酶切纯化后载体浓度为20 ng/μL,纯化后目的片段浓度为50 ng/μL。

载体摩尔浓度 $C_{\text{载}}=(20 \times 1000)/(5000 \times 650)=0.0061 \text{ pmol}/\mu\text{L}$;

片段摩尔浓度 $C_{\text{片}}=(50 \times 1000)/(2000 \times 650)=0.038 \text{ pmol}/\mu\text{L}$;

取20 ng载体用于同源重组,则载体物质的量为:

$N_{\text{载}}=(20 \times 1000)/(5000 \times 650)=0.0061 \text{ pmol}$;

根据 $N_{\text{载}}:N_{\text{seg1}}=1:5$,则 $N_{\text{seg1}}=5 \times 0.0061=0.0305 \text{ pmol}$;

载体与片段所需体积分别为:

$V_{\text{载}}=N_{\text{载}}/C_{\text{载}}=0.0061/0.0061=1 \mu\text{L}$

$V_{\text{seg1}}=N_{\text{seg1}}/C_{\text{载}}=0.0305/0.038=0.8 \mu\text{L}$

重组体系如下表所示:

载体体积	Seg 1体积	2×Mix体积	水体积
1 μL	0.8 μL	5 μL	3.2 μL

2) 吸打混匀各组分,短暂离心后,50°C反应15 min。

3) 取10 μL连接产物转化100 μL褊科超级感受态(目录号:TSC-C01)。

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Seamless Cloning Mix浓度为1×即可。

2. 多片段重组

将Seg1、Seg2和Seg3三个片段重组到载体pCAMBIA1300上,其中Seg2为色素蛋白基因,表达后使菌落呈蓝色。pCAMBIA1300载体约9 kb,片段大小分别为1 kb、0.9 kb和1.2 kb,载体用BamHI单酶切,载体与各个片段的摩尔比 $N_{\text{载}}:N_{\text{seg1}}:N_{\text{seg2}}:N_{\text{seg3}}=1:1:1:1$ 。

1) 计算连接体系

经测定载体酶切回收后浓度为20 ng/μL,Seg1回收浓度为50 ng/μL,Seg2回收浓度为38 ng/μL,Seg3回收浓度40 ng/μL。

载体摩尔浓度 $C_{\text{载}}=(20 \times 1000)/(9000 \times 650)=0.00341 \text{ pmol}/\mu\text{L}$;

Seg1摩尔浓度 $C_{\text{seg1}}=(50 \times 1000)/(1000 \times 650)=0.077 \text{ pmol}/\mu\text{L}$;

Seg2摩尔浓度 $C_{\text{seg2}}=(38 \times 1000)/(900 \times 650)=0.065 \text{ pmol}/\mu\text{L}$;

Seg3摩尔浓度 $C_{\text{seg3}}=(40 \times 1000)/(1200 \times 650)=0.052 \text{ pmol}/\mu\text{L}$;

取线性化载体50 ng用于同源重组,则50 ng质粒对应物质的量为 $N_{\text{载}}=(50 \times 1000)/(9000 \times 650) \approx 0.0085 \text{ pmol}$;组装三个片段,体系中载体与各个片段的摩尔比 $N_{\text{载}}:N_{\text{seg1}}:N_{\text{seg2}}:N_{\text{seg3}}$ 为1:1:1:1,所以每个片段的物质的量 $N_{\text{seg1}}=N_{\text{seg2}}=N_{\text{seg3}}=0.0085 \text{ pmol}$,根据体积V=摩尔量N/摩尔浓度C,可计算载体和每个片段加入的体积:

$V_{\text{载}}=N_{\text{载}}/C_{\text{载}}=0.0085/0.00341=2.50 \mu\text{L}$

$V_{\text{seg1}}=N_{\text{seg1}}/C_{\text{seg1}}=0.0085/0.077=0.11 \mu\text{L}$

$V_{\text{seg2}}=N_{\text{seg2}}/C_{\text{seg2}}=0.0085/0.065=0.13 \mu\text{L}$

$V_{\text{seg3}}=N_{\text{seg3}}/C_{\text{seg3}}=0.0085/0.052=0.16 \mu\text{L}$

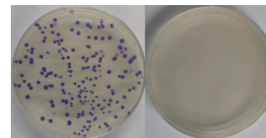
重组体系如下表所示:

载体体积	Seg 1体积	Seg 2体积	Seg 3体积	2×Mix体积	水体积
2.50 μL	0.11 μL	0.13 μL	0.16 μL	5 μL	2.10 μL

2) 吸打混匀各组分,短暂离心后,50°C反应30 min。

3) 取10 μL连接产物转化100 μL DH5α感受态。

克隆结果如图所示:蓝色菌落为阳性克隆。



组装3个片段 阴性对照

■ 保存条件

-25~-15°C保存,保质期1年,低温运输。

■ 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。

