



Trelief® Seamless Cloning Kit

Trelief® 无缝克隆试剂盒

目录号

DLV201-20
DLV201-100

产品简介

本产品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5~15 min即可进行转化, 克隆阳性率可达95%以上。其工作原理如下:

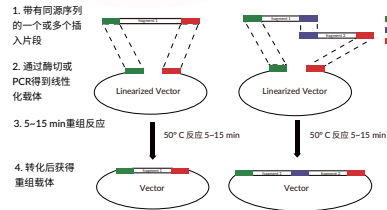


图1 试剂盒原理图

产品组成

组分	DLV201-20 (20次)	DLV201-100 (100次)
2× Seamless Cloning Mix	100 μL	500 μL
Control Vector (5 ng/μL) ^a	10 μL	10 μL
Control Template (10 ng/μL) ^b	10 μL	10 μL

a. 线性化质粒, 抗性为Amp, 含M13F/R序列;

b. 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5~15 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。

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, 推荐使用达领T8高保真PCR预混液(目录号: DLP201)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

线性化的克隆载体必须进行凝胶纯化(推荐使用达领DNA凝胶回收试剂盒(安全便捷型), 目录号: DLN801)并电泳检测其质量和浓度。

2. 设计片段克隆引物

载体之间各有一段同源序列。片段克隆引物由两部分构成: 重叠区域+目的片段特异性引物。

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+反向特异性引物序列。

注: 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) 克隆引物设计示例 (以 Sac I/BamH I 双酶切载体为例)

特异性引物如下:

F: 5'-TCACCTGTGGGATATCCGGTG-3'

R: 5'-CGCATAAGCGAATGTTCTGAAG-3'

载体序列如下(红色部分为重叠区域, 黄色部分为酶切位点):

5'...GCTCGAGCA**CCACGGCCG**CAGAGCT**TC**...G**ATCCGTT**ACATCGTATAACGTTAC...3'

3'...CGAGCTCGTGGTGCCGGCG**TC**CGAG...**CTCGAG**...**CCTACG**CAATGTAGCATATTGAATG...5'

片段克隆引物如下:

F: 5'-CCACGGCCG**CAGAGCTC**TCACCTGTGGGATATCCGGTG-3'

R: 5'-ACGTTATACGATGTAACGGATCCCGCATAAGCGAATGTTCTGAAG-3'

3. 准备插入片段

用上述设计好的克隆引物扩增目的基因片段, 推荐使用达领T8高保真PCR预混液(目录号: DLP201), 扩增产物连接之前必须进行凝胶纯化(推荐使用达领DNA凝胶回收试剂盒(安全便捷型), 目录号: DLN801)并电泳检测其质量和浓度。

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. 配制重组体系 (10 μL)

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)

用量计算公式：
片段用量 (ng) =(摩尔比例倍数×载体用量 (ng) ×片段长度 (kb))/载体长度 (kb)
体积=用量 (ng) /浓度 (ng/μL)

用量计算示例：
将2 kb的目的片段连入5 kb的载体中；
目的片段浓度为50 ng/μL，载体浓度为20 ng/μL，载体用量为20 ng；
摩尔比例倍数为3 (载体比片段摩尔比=1:3)。
片段用量 (ng) =(3×20×2)/5=24 ng
片段体积 (μL) =24/50=0.48 μL
载体体积 (μL) =20/20=1 μL

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。

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，50℃反应5~15 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

按照相关感受态产品说明书操作。

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，加长连接时间至30~45 min，并适当增加菌落鉴定数量，可以提高正确克隆的获得率。

- 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。

应用实例

将来自于不同物种的959 bp、2087 bp与2580 bp目的片段分别连入pET-28a载体与pUC19载体中。克隆效果如下图所示：平板长菌数多，菌落鉴定阳性率高。

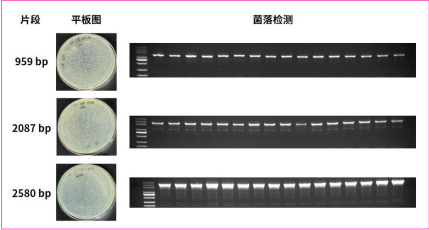


图2 不同长度与来源片段单片段重组效果

保存条件

-25~-15℃保存，保质期1年。≤0℃运输。

常见问题与解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
不长菌落或菌落极少	感受态效率低	使用高效感受态细胞，推荐达领Trelief® 5α感受态细胞 (目录号：DLC101)
	线性载体和插入片段不纯，抑制反应	再次纯化去除盐分的干扰。纯化产物推荐溶解保存在ddH ₂ O中
	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
多数克隆不含插入片段	克隆载体线性化不完全	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
	反应体系中混入了相同抗性的质粒	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
克隆含有不正确的插入片段	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
菌落或菌液PCR验证无目的条带	PCR程序或者体系不合适	优化PCR条件后重新实验 (推荐使用达领T5菌P专家，目录号：DLP102)
	载体线性化或原始质粒消化不完全	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
菌液PCR正确，但测序结果无信号	特异性引物造成的假阳性结果	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

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。

关联产品推荐

产品名称	货号	应用
FlashPure快速质粒小提试剂盒	DLN702	适用于1~5 mL菌液质粒DNA快速提取
T8高保真PCR预混液	DLP201	适用于基因组、cDNA、噬菌体、质粒等模板的扩增
T5菌P专家	DLP102	适用于克隆鉴定、以微生物为模板的直接扩增实验
BL21(DE3)感受态细胞	DLC201	适用于含有T7启动子的表达载体高效表达
Trelief® 5α感受态细胞	DLC101	适用于常规克隆、蓝白斑筛选等实验

