

Trelief® 1-Minute Single-Insert Cloning Kit

Trelief® 单片段 1 min 快速克隆试剂盒

目录号

DLV202-20

产品简介

本产品是专为单片段快速克隆设计的 DNA 定向克隆试剂盒，采用同源重组技术，1 分钟内即可完成片段定向插入载体。该试剂盒可将 PCR 产物克隆至任意载体位点，高效处理 50 bp-20 kb 的 DNA 片段。使用时，只需线性化载体并在 PCR 引物 5'端添加 15~25 nt 的同源序列，确保 PCR 产物两端与载体末端序列匹配。混合匹配后的 PCR 产物与线性载体，在 50°C 下经重组酶催化 1 分钟，即可转化完成定向克隆，克隆阳性率超过 95%。

产品组成

组分	规格
2 × 1-Minute Single-Insert Cloning Mix	100 µL
Control Vector (5 ng/µL) ^a	10 µL
Control Template (10 ng/µL) ^b	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

- ◆ 单片段无缝克隆；
- ◆ 定点突变；
- ◆ 高通量克隆。

产品特点

- ◆ 快速：单片段重组反应仅需要 1 min；
- ◆ 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，以减少因转化背景干扰而产生的假阳性结果。
- 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
线性化的克隆载体务必进行凝胶纯化步骤（推荐使用达领 DNA 凝胶回收试剂盒（安全便捷型），目录号：DLN801），并通过电泳检测其纯度和浓度。

2. 设计片段克隆引物

1) 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℃（A-T pair=2℃，G-C pair=4℃），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。

2) 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**CCACGGCCGAGAGCTC** **GGATCC**GTTACATCGTATAACGTTAC.....-3'
3'-...CGAGCTCGTGGTGCCGGCGGT**CTCGAG** **CCTAGGCAATGTAGCATATTGCAATG**...-5'

片段克隆引物如下：

F: 5'-**CCACGGCCGAGAGCTC**TCACCTGTGGGATATCCGGTG-3'

R: 5'-**ACGTTATACGATGTAACGGATCC**CGCATAAGCGAATGTTCTGAAG-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）并电泳检测其纯度和浓度。

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℃失活 Dpn I 后再用于重组实验。

4. 配制重组体系（10 μL）

组分	用量
线性化载体	X μL
插入片段	Y μL
2×1-Minute Single-Insert 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。

载体和片段摩尔比为 1:2~1:5；

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）。

片段用量计算如下：

片段用量（ng）=(3×载体用量（20 ng）×载体大小（2 kb）)/目的片段大小（5 kb）=24 ng；

片段体积（μL）=片段用量（24 ng）/片段浓度（50 ng/μL）=0.48 μL

载体体积（μL）=载体用量（20 ng）/载体浓度（20 ng/μL）=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 1-Minute Single-Insert Cloning Mix 浓度为 1×即可。

5. 重组反应

体系配制完成后, 请充分混匀各组分, 短暂离心将反应液收集至管底, 50℃ 反应 1 min 即可, 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才可使用, 否则未切开的载体会影响后续的阳性克隆鉴定。
- 配制重组体系时, 应先加线性化载体、片段和水, 最后加 2×1-Minute Single-Insert Cloning Mix , 体系配制过程需在冰上进行, 配制完后应立即用于重组反应。

应用示例

本试剂盒将来自不同物种的 959 bp、2987 bp、3019bp 与 4776bp 目的片段有效连入 pET-28a 载体与 pcDNA3.1 载体中。克隆效果如下图 1 所示: 平板上长菌数量多, 且菌落鉴定结果显示阳性率高。

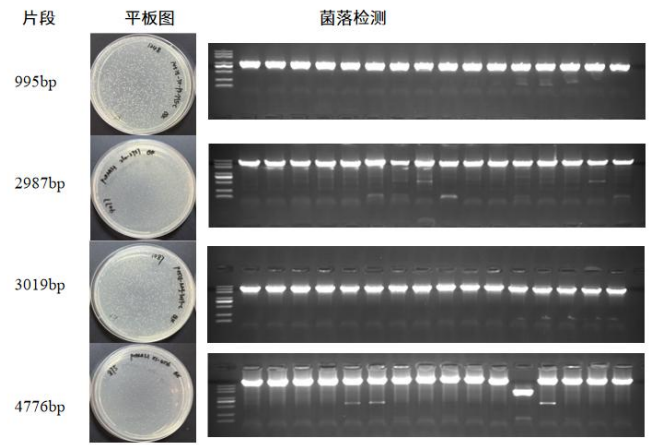


图 1 不同长度与来源片段单片段 1min 重组效果

保存条件

-25~-15℃保存, 保质期 1 年。≤0℃运输。

常见问题及解决方案

常见问题	可能原因	解决方案
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® 5a 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

