

Trelief® Multi-Fragment Cloning Kit

Trelief® 多片段无缝克隆试剂盒

目录号

DLV203-50

产品简介

本产品是专为多片段克隆设计的 DNA 定向克隆试剂盒，采用同源重组技术，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℃ 反应 5~60 min 即可进行转化，克隆阳性率可达 95% 以上。

产品组成

组分	规格
2× Multi-Fragment Cloning Mix	250 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

- ◆ 本多片段无缝克隆；
- ◆ 定点突变；
- ◆ 高通量克隆。

产品特点

- ◆ 多片段克隆：线性化载体可高效组装 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

线性化的克隆载体务必进行凝胶纯化（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

- 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°C (A-Tpair=2°C, G-Cpair=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。

- 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'...GCTCGAGCACCCAGGCCGAGAGCTC GGATCCGTTACATCGTATAACGTTAC...-3'

3'...CGAGCTCGTGGTCCCGCGTCTCGAG CCTAGGCAATGTAGCATATTGCAATG...-5'

片段克隆引物如下：

F: 5'-CCACGCCGCGAGAGCTCTCACCTGTGGGATATCCGGTG-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× Multi-Fragment 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 50~200 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 50 ng；摩尔比例倍数为 3 (载体比片段摩尔比=1:3)。

片段用量 (ng) = (3×50×2)/5=60 ng

片段体积 (μL) = 60/50=1.2 μL

载体体积 (μL) = 50/20=2.5 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 2× Multi-Fragment 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 5~60 min。需在 PCR 仪或水浴锅等温度精确的仪器上进行。

注：插入 1~2 个片段时，推荐反应时间为 15 min；插入 3~5 个片段时，推荐反应时间为 30 min；当载体骨架在 10 kb 以上或插入片段在 4 kb 以上时，建议延长反应时间到 30~60 min。

重组反应结束后，建议将反应液离心管置于冰上冷却，之后进行转化或者储存于 -20℃；-20℃储存的重组产物，建议在 1 周内使用。

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× Multi-Fragment Cloning Mix，体系配制最好在冰上，配制完后应立即用于重组反应。

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®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
	平板抗性不足	确保使用正确的抗生素，并使用新鲜制备的抗生素平板。
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
	多重复序列片段	插入片段中含有多个重复序列，推荐使用适合重复序列 DNA 片段克隆的感受态细胞或者采用酶切连接或 GoldenGate 方法进行克隆。
	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）
菌落或菌液 PCR 验证无目的条带	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

说明书版本号

1.1.1.V203.2607

