

Minerva Super Fusion Cloning Kit

1 产品基本信息

产品名称: One-Step Seamless Cloning Kits

产品编号: MF1808

2 规格或纯度

10 μL \times 20 T, 10 μL \times 50 T

3 产品介绍

产品简介:

无缝克隆是一种简便、快速且高效的 DNA 定向克隆技术, 能将插入片段快速定向克隆到任意载体的任意位点。操作时, 先通过任意方法使载体线性化, 再在插入片段的正向与反向扩增引物 5' 端引入线性化载体的末端序列, 从而让 PCR 产物的 5' 端和 3' 端最末端, 分别携带与线性化载体两末端一致的 15-25 bp 序列。随后在重组酶作用下, 具有重叠区域的片段与载体可在 50°C 条件下最快 5 分钟内完成重组, 实现无缝克隆, 且该技术的克隆阳性率能达到 95% 以上。具体流程可参见图 1。

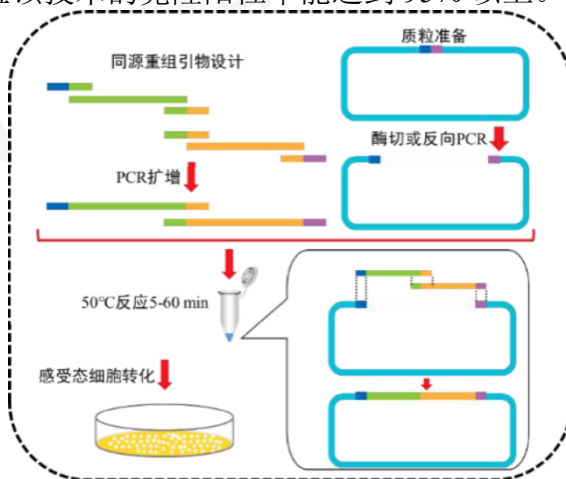


图 1 流程示意图

产品特点:

- 操作简便: 无需依赖连接酶, 不受酶切位点限制, 无需对片段进行酶切处理; 同时可避免载体自连问题。
- 重组高效: 单次反应即可完成单个或多个片段的重组, 重组过程仅需 5~60 分钟。
- 性能优异: 支持长片段连接, 其效率可与 NEB 无缝克隆试剂盒相媲美。

适用范围:

适用于 1~5 个片段的快速无缝克隆, 载体构建、基因合成、定点突变和高通量克隆实验。

产品组分:

组分	M10701(10 μL \times 20 T)	M10701(10 μL \times 50 T)
A. 2 \times Super Fusion Cloning Mix	100 μL	250 μL
B. Control Plasmid, linearized (Amp ⁺ , 40 ng/ μL)	5 μL	5 μL
C. 500 bp Control Fragment (20 ng/ μL)	5 μL	5 μL

4 储存与运输

储存条件: -20 °C 避光保存;

运输条件：冰袋运输。

5 使用方法（仅供参考）

5.1 制备线性化克隆载体

选择合适的克隆区域对载体进行线性化，此区域的选择应该尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域以提高线性化程度，线性化载体可以通过酶切或者反向 PCR 扩增制备。

5.1.1 酶切制备

优先推荐双酶切，此方法会使载体线性化更完全，转化背景（假阳性克隆）低。经双酶切进行线性化的载体无需去磷酸化。

如果使用单酶切，可通过适当延长酶切时间来减少环状质粒的残留。平末端或粘末端均可，但是酶切完全是根本关键。注意，单酶切的线性化载体需要去磷酸化。

注：

- (1) 酶切完成后，应将快速内切酶失活或对目的产物纯化后再用于重组反应；
- (2) 酶切后需进行胶回收纯化时，可以通过核酸琼脂糖凝胶电泳进行检测产物。

5.1.2 反向 PCR 扩增制备

推荐使用预线性化载体质粒 DNA 为模板，以减少环状质粒模板对克隆阳性率的影响。如果模板为环状质粒时，扩增产物建议使用 *Dpn I* 消化后使用。扩增产物建议使用推荐使用高保真 PCR Mix 进行扩增，克隆位点为分界点，设计一对反向引物。扩增产物也可以行胶回收纯化，并通过核酸琼脂糖凝胶电泳进行检测产物。

5.2 设计插入 PCR 引物片段

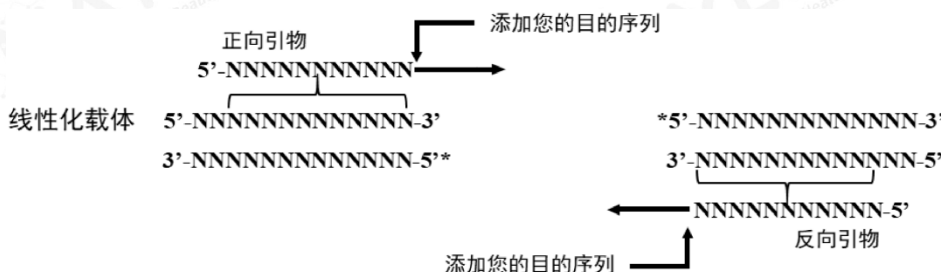
PCR 引物的 5' 端必须包含与其待重组的相邻片段或载体末端同源的 15~25 nt（推荐 18 nt，不包括酶切位点）序列，使得扩增后的插入片段末端带有和线性化载体末端一致的同源序列。

F 正向引物（5'-3'）：上游载体重叠区域 + 酶切位点（可选）+ 正向特异性引物扩增序列

R 反向引物（5'-3'）：下游载体重叠区域 + 酶切位点（可选）+ 反向特异性引物扩增序列

注：

- (1) 若载体为粘性末端，且 3' 端突出，则引物设计必须包含部分；若 5' 端突出，则引物设计可以包含突出部分也可以不包含；
- (2) 尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域进行克隆，当载体克隆位点上下游 25 nt 区域内 GC 含量为 40%~60% 时，重组效率最高；
- (3) 计算扩增引物 Tm 值时，只需计算特异引物的 Tm 值，引入的额外序列无需计算。



5.2.1 插入片段的 PCR 扩增

插入片段可用任意 PCR 酶（Taq 酶或高保真酶）扩增，无需考虑产物末端有无 A 尾（重组过程中将被去除，在最终质粒中不会出现）。建议使用高保真聚合酶进行扩增以减少扩增突变的发生。建议使用纯化后的 PCR 产物进行无缝克隆反应，若 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定为特异性扩增产物，可直接用于无缝克隆反应，但加样的体积不宜超过反应总体积的 20%。

5.2.2 无缝克隆反应

● 冰水浴中配制以下反应体系：

组分	反应体系	阴性对照(1)	阴性对照(2)	阳性对照(如有必要)
2× Super Fusion Cloning Mix	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
线性化载体 ^a	50~200 ng	50~100 ng		1 μL
插入片段 ^b	10~200 ng		10~100 ng	500 bp, 1 μL
ddH ₂ O	Up to 10 μL			

(a) 最适载体用量 (ng) = 0.02 × 载体碱基对数，即 0.03 pmol。

(b) 插入单片段时，最适片段用量 (ng) = 0.04 × 片段碱基对数；插入多片段时，每片段最适用量 (ng) = 0.02 × 片段碱基对数。

注：

- (1) 如果插入的单片段长度大于载体，那么应互换载体与插入片段用量；
- (2) 如果插入的片段长度小于 200 bp，那么要使用 5 倍载体的用量；
- (3) 如果按上述公式计算得到的用量低于最低/高于最高值，那么建议直接按最低/最高用量使用；
- (4) 载体或插入片段过长，片段数量过多，均会降低阳性率；
- (5) 阴性对照(1)检验线性化载体中有无背景质粒残留；阴性对照(2)当插入片段扩增模板是与克隆载体抗性相同的环状质粒时，推荐进行；
- (6) 若某一组分浓度过高可适当稀释后使用，每一个组分的用量最好不低于 1 μL；
- (7) 体系配制完成后，轻轻吹吸数次混匀各组分，避免产生气泡即可，切勿涡旋。

● 将反应体系置于 50 °C，反应 5~60 min。

注：

- (1) 推荐使用温控比较精准的仪器进行反应，如 PCR 仪，反应时间不足或过长都会降低克隆效率；
- (2) 插入 1~2 个片段时，推荐反应时间为 5~15 min；插入 3~5 个片段时，推荐反应时间为 15~30 min；
- (3) 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；
- (4) 50 °C 反应完成后，建议进行瞬时离心，将反应液收集至管底。

● 将反应液离心管置于冰水浴中冷却，建议即时转化或储存于 -20 °C。

注：-20 °C 储存的重组产物，建议在 1 周内使用。

5.3 克隆产物转化

在 100 μL 感受态细胞中加入 5~10 μL 反应液（体积不超过所用感受态细胞体积的 1/10），轻轻混匀，置于冰上 25 min。然后 42 °C 热激 45~60 s，迅速转入冰浴中静置 2- 5 min。加入 500~700 μL SOC 或 LB 培养基（不含抗生素的无菌培养基），混匀后 37 °C 振荡培养 40~60 min（200 rpm）。根据实验需要，将菌液均匀涂布在含相应抗生素的平板上，将平板倒置于 37 °C 培养箱培养过夜。

注：

- (1) 不同感受态细胞最后的克隆阳性率会有所差别，推荐使用转化效率 > 108 cfu/μg 的感受态细胞；
- (2) PCR 产物与线性化载体的数量和纯度决定了菌落数；
- (3) 阳性对照平板通常生长大量白色单菌落，阴性对照平板只生长很少的菌落。

5.4 阳性克隆检测

5.4.1 菌落/菌液 PCR 鉴定：

挑取单菌落至 10 μL ddH₂O 中混匀，取 1 μL 作模板，或直接蘸取菌落进行菌落 PCR 鉴定（建议菌落 PCR 时，至少使用一条通用引物，可有效避免假阳性结果）；

5.4.2 以质粒为模板 PCR 鉴定:

挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中, 37 °C, 200 rpm 过夜摇菌后抽提质粒作为模板, 可使用载体通用引物或特异性引物扩增;

5.4.3 酶切鉴定 (若有需要):

挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中, 37°C, 200 rpm 过夜摇菌后抽取质粒, 使用相应内切酶切质粒后电泳检测片段大小。

注:

(1) 必要时可进一步对阳性结果进行测序鉴定;

(2) 测序引物序列: M13F: TGTAACGACGCGCCAGT; M13R: CAGGAAACAGCTATGAC;

6 常见问题

Q1: 转化效率低甚至是不长克隆都是由哪些原因造成的?

答:

- (1) 感受态细胞因为保存时间或者质量不佳会引起转化效率低下, 建议使用新制备的感受态细胞或者质量上佳的感受态细胞;
- (2) 线性化载体或插入片段比例不佳。请严格按照说明书推荐的方法计算各组分量, 用琼脂糖凝胶电泳检测样品质量以及浓度;
- (3) EDTA 等金属离子螯合剂会抑制无缝克隆实验;
- (4) 胶回收制备, 最后洗脱时需要用水洗脱, 不能用 TE Buffer 进行洗脱, 用于重组反应的胶回收产物要溶解于 ddH₂O;
- (5) 插入片段纯度差;
- (6) 引物设计有误, 设计时特别注意反向引物的序列顺序。

Q2: 菌落 PCR 验证时为什么会出现大量空载体?

答:

- (1) 载体线性化不完全, 没有完全切开;
- (2) 目的片段投入过低, 导致连接失败。

Q3: 多数克隆不含插入片段?

答:

- (1) 相同抗性质粒污染。PCR 扩增模板为环状质粒时, 如扩增产物未纯化直接用于重组反应时推荐 *Dpn* I 消化, 或者对扩增产物进行胶回收纯化;
- (2) 克隆载体及片段中含有质粒背景。克隆载体线性化不完全, 酶切制备线性化载体时, 要提高快速内切酶的使用量并延长反应时间, 使用胶回收纯化酶切产物; 制备插入片段时尽量用预线性化质粒作为扩增模板, 扩增产物进行 *Dpn* I 消化以及进行凝胶回收纯化;
- (3) PCR 产物混有非特异扩增产物: 优化 PCR 体系, 提高特异性; 胶回收 PCR 产物; 鉴定更多的克隆。

Q4: 假阳性/测序无信号/空载体?

答:

- (1) 质粒载体残留导致的假阳性: 设置阴性对照来排查, 如果阴性对照长了很多, 可能是模板投入量过多或者未进行 *Dpn* I 消化。若以质粒为模板 PCR 获得片段/载体: 质粒投入量不宜过多 (<1 ng), 否则可能导致 *Dpn* I 消化不完全而造成假阳性。建议 PCR 产物进行凝胶回收纯化, 纯化产物溶解在 ddH₂O 中;

(2) 挑斑方法不合适：重组产物 3' 端与 5' 端未连接，需要到感受态细胞中进行修复，斑点相对来说会小点；平板营养不均匀会导致斑点大小有差异；重组质粒相对原始质粒来说，有可能会影响细胞的生长。建议选取平板上某一块区域，同时挑选大斑和小斑，以增加挑到重组产物的概率；

(3) 菌检引物不合适：建议使用载体通用引物或者引物一端在载体上，一端在目的片段上。如果用目的片段引物进行菌液 PCR，可能会出现菌检有结果而测序无结果。

Q5: 插入片段出现碱基突变?

答：

(1) 测序的样本数：如果只测了一个样本，不一定可信，需要多测几个样本；

(2) 分析测序结果：检查突变处的测序信号是否有问题，若为双峰或者杂峰则不一定可信；

(3) 检查突变位点：如果多个结果突变位点一致，可能是从模板上引入的或者模板序列与 NCBI 上不一致；

(4) 插入片段在 PCR 获得时建议使用高保真聚合酶；

(5) 若引物处发生碱基突变，考虑是引物合成问题，建议重新合成引物进行实验。

7 注意事项

- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。