

单片段重组克隆试剂盒

PreMix

本公司有多种零背景即用型线性化载体

单片段重组克隆试剂盒	GA03A	10 次
	GA03B	20 次
	GA03C	50 次

保存条件

-20° C 保存。

可于-20~0° C 运输。

~使用过程中避免反复冻融。

产品组成

组分	GA03A	GA03B	GA03C
2×重组酶 PreMix	100 µl	200 µl	500ul
500 bp control insert (20 ng/µl)	5 µl	5 µl	5ul
linearized control vector (50 ng/µl, Amp ^r)	5 µl	5 µl	5ul

产品说明

本试剂盒为单片段重组克隆试剂盒的优化版，且为 2×Mix 形式，便于使用。可以将 DNA 片段高效插入载体的任意位点，克隆中不需要 T4 DNA 连接酶。

重组克隆是一种简单、快速、高效的 DNA 无缝克隆技术，可将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。首先将载体线性化，通过在 PCR 引物 5'端加入线性化载体的 15-20 个碱基的末端序列，使得 PCR 产物 5'和 3'末端带有和线性化载体末端相同的序列。将该 PCR 产物和线性化载体按一定比例混合后，在重组酶作用下，50° C 反应 15-30 min 即可进行转化，完成定向克隆。

本公司重组克隆试剂盒基于独特的非连接酶依赖体系，极大地降低了载体自连背景，阳性克隆率可达 95% 以上。改良的重组酶与优化的反应缓冲液，显著提高重组效率，使得线性化载体与插入片段不进行纯化直接用于重组克隆成为可能，极大的简化了实验步骤。

特点

- ◇ 克隆位点任意选择
- ◇ PCR 产物直接克隆
- ◇ 多基因同时克隆
- ◇ 阳性克隆率高
- ◇ PreMix 形式操作更方便

适用范围

- ◇ 快速克隆
- ◇ 高通量克隆
- ◇ 无缝克隆
- ◇ DNA 定点突变

插入片段



单片段基因重组原理图

订货网址: <http://www.angmeibio.com>

订货热线: 4006609586

自备材料

目的片段 PCR 模板、引物；线性化载体；高保真聚合酶；

化学感受态细胞；

◆ DH5a Competent cell 常规克隆，适用于 <15 kb 质粒；

◆ XL 10 Competent cell 大片段克隆，适用于 > 10 kb 质粒；

其他材料：ddH₂O、PCR 管、PCR 仪等。

实验流程概要

A. 载体线性化：通过酶切或反向 PCR 获得线性化载体。

B. 插入片段：将线性化载体末端 15-20bp 序列作为同源序列（红色和蓝色标记），并将其分别添加到基因特异性正 / 反向扩增引物序列的 5'端，以此引物对扩增得到带有同源序列的插入片段。

C. 重组反应：将线性化载体和插入片段按比例混合，在重组酶催化下，50° C 反应 30 min 即可完成重组反应，实现线性化载体与插入片段 DNA 的体外环化。

D. 转化感受态细胞：重组产物直接进行转化，平板上会形成数百个单克隆，后期菌落 PCR 阳性筛选。

实验步骤

01 线性化载体制备

1. 选择合适的克隆位点，对载体进行线性化。尽量选择无重复序列且载体克隆位点上下游 20 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：可以选择限制性内切酶酶切消化，或反向 PCR 扩增。

◆ 酶切制备线性化载体时，推荐使用双酶切方法使载体线性化完全，降低转化背景（假阳性克隆）；若使用单酶切线性化，请适当延长酶切时间以减少环状质粒残留，降低转化背景。本公司有售常见的限制性内切酶，详见公司网站。

◆ 重组反应体系内无 DNA 连接酶，不会引发载体自连。因此，即使是单酶切方式制备的线性化载体也无需进行末端脱磷酸处理。重组产物转化后出现的假阳性克隆（无插入片段），是由未线性化环状载体转化而形成。

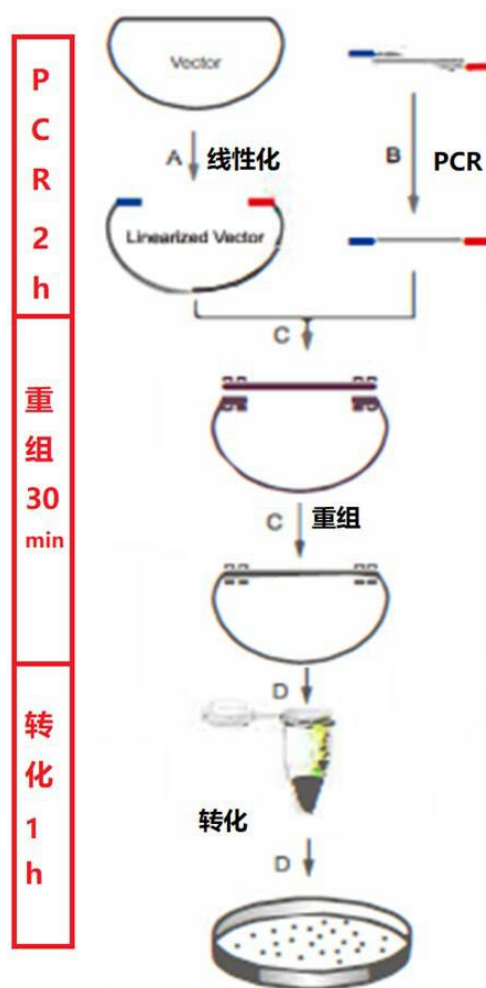


Fig 1. 重组克隆技术原理图

◆ 反向 PCR 扩增制备线性化载体时，推荐使用高保真聚合酶。50ul 的 PCR 体系中，推荐使用 1-5ng 环状质粒模板，或使用预线性化质粒作为模板，以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。另外利用限制性内切酶 DpnI 对 PCR 产物进行处理，可以特异性去除环状质粒模板，降低环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。本公司有售高保真聚合酶与 DpnI 限制性内切酶，详见公司网站

02 插入片段获得

1 插入片段引物设计总原则：在插入片段正反向扩增引物的 5'端引入线性化载体两末端同源序列，使扩增后的插入片段 5'和 3'最末端分别带有和线性化克隆载体两末端对应一致的同源序列。

插入片段正向扩增引物设计方式为：

5'-上游载体末端同源序列+酶切位点（可保留或删除）+插入片段特异性正向扩增引物序列-3'

订货网址：<http://www.angmeibio.com>

订货热线：4006609586

插入片段反向扩增引物设计方式:

5'-下游载体末端同源序列+酶切位点(可保留或删除)+插入片段特异性反向扩增引物序列-3'

● 插入片段特异性正/反向扩增引物序列 Tm 值 55-65℃ 为佳;

● 上/下游载体末端同源序列即线性化载体最末端序列(用于同源重组), GC 含量 40-60% 为佳, 长度为 15-20 个碱基。插入片段引物设计可参照以下实例:

1. 双酶切 (BamHI/EcoRI) 线性化质粒⁴
5'...AGTTAGCATCAGCACCATTGA^{16bp}GGATCC-插入片段-GAATTCAGCAGCGGCTGGTCA^{16bp}TATGA...3'
3'...TCAATCGTAGTGGTGGTAAC^{16bp}CCTAGG-插入片段-CCTAAGCGTCGCGGACCAATATACT...5'
插入片段正向引物序列: 5' GCATCACCACCATTTGAGGATCCatgaagtaacttctgtgtct⁴
插入片段反向引物序列: 5' TGACCAAGCGCGCTGCTGAATTCctatctctgtttctgtgaaca⁴
2. 单酶切 (BamHI) 线性化质粒⁴
5'...AGTTAGCATCAGCACCATTGA^{16bp}GGATCC-插入片段-GGATCCAGCAGCGGCTGGTCA^{16bp}TATGA...3'
3'...TCAATCGTAGTGGTGGTAAC^{16bp}CCTAGG-插入片段-CCTAAGCGTCGCGGACCAATATACT...5'
插入片段正向引物序列: 5' GCATCACCACCATTTGAGGATCCatgaagtaacttctgtgtct⁴
插入片段反向引物序列: 5' TGACCAAGCGCGCTGCTGGATCCctatctctgtttctgtgaaca⁴
3. 反向 PCR 线性化质粒⁴
5'...AGTTAGCATCAGCACCATTGA-插入片段-AGCAGCGGCTGGTCA^{16bp}TATGA...3'
3'...TCAATCGTAGTGGTGGTAAC^{16bp}-插入片段-TCGTCGCGGACCAATATACT...5'
插入片段正向引物序列: 5' GCATCACCACCATTTGatgaagtaacttctgtgtct⁴
插入片段反向引物序列: 5' TGACCAAGCGCGCTGCTctatctctgtttctgtgaaca⁴

图注如下:⁴

- 插入片段上游载体同源区, 插入片段下游载体同源区, 插入片段特异性序列⁴
- 若酶切线性化载体时, 插入片段引物中不包含酶切位点, 则重组后质粒的⁴
插入片段上下游无酶切位点⁴

◆ 如果最终引物长度超过 40 bp, 推荐引物合成时选用 PAGE 纯化, 有助于提高克隆成功率。计算扩增引物退火温度时, 只需计算基因特异性扩增序列的 Tm 值, 引入的同源序列及酶切位点不计算在内。

2. 插入片段 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, 在最终载体中不会出现)。但为了减少扩增突变的引入, 推荐使用高保真聚合酶进行扩增。

03 线性化载体与插入片段的使用量

1. 浓度测定:

◆ 若线性化载体与插入片段已通过高质量的试剂盒进行胶回收纯化, 且经电泳检测无明显杂带或 Smear 残留时, 也可使用 Nanodrop 等基于吸光值的仪器进行浓度测

定, 但只有当 A_{260}/A_{280} 在 1.8-2.0 之间时浓度值可信。当样品浓度低于 10 ng 时, 不同型号的仪器基于 A_{260} 得到的浓度值可能存在较大差异, 推荐电泳观测条带亮度的方法对 DNA 浓度进行定性测定, 或使用 Qubit、PicoGreen 等进行浓度测定。

◆ 若线性化载体或插入片段未经纯化, 请务必按照下图所示, 通过电泳比较条带亮度的方法对 DNA 进行定量。将线性化载体和插入片段分别做数个梯度稀释后, 原液和稀释后产物各取 1ul 上样进行电泳, 与标准的 DNA 定量 Marker (条带浓度均一旦确定) 比较条带亮度以确定其近似浓度。

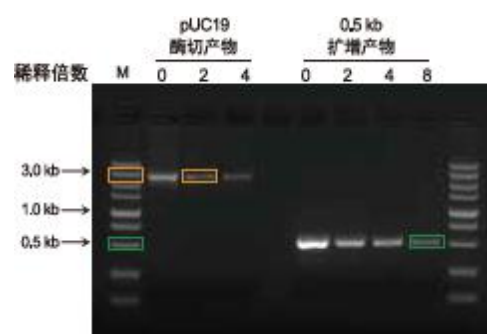


Fig 3. 线性化载体和插入片段凝胶电泳浓度检测
例如 M: DL5,000 Marker。上样 5 μl, 除 1.0 kb 条带为 100 ng 以外, 其余条带 DNA 量均为 50 ng。图中橙色框/绿色框分别标记线性化载体和插入片段在某个稀释梯度下与相近大小的 Marker 条带亮度相似。
因此: Vector 浓度约为: $50 \text{ ng} \times 2 = 100 \text{ ng/ul}$ 。

Insert 浓度约为: $50 \text{ ng} \times 8 = 400 \text{ ng/ul}$ 。

2. 载体片段使用量计算:

单片段重组反应体系最适克隆载体使用量为 0.03 pmol, 最适插入片段使用量为 0.06 pmol (载体与插入片段摩尔比为 1:2)。可由以下公式粗略计算对应摩尔数的 DNA 纳克数。

最适克隆载体使用量(0.03 pmol) = $[0.02 \times \text{克隆载体碱基对数}] \text{ ng}$

最适插入片段使用量(0.06 pmol) = $[0.04 \times \text{插入片段碱基对数}] \text{ ng}$

例如，将长度为 1 kb 的插入片段克隆至长度为 5 kb 的克隆载体时，克隆载体的最适使用量应为： $0.02 \times 5000 = 100 \text{ ng}$ ；插入片段最适使用量应为： $0.04 \times 1000 = 40 \text{ ng}$ 。

a. 当插入片段长度大于克隆载体时，克隆载体最适用量为 0.06pmol，插入片段最适用量为 0.03pmol，并按该用量计算克隆载体与插入片段对应的纳克数。

b 线性化克隆载体的使用量应在 50-200 ng 之间；插入片段扩增产物的使用量应在 10-200ng 之间。

c. 线性化克隆载体和插入片段未经纯化时，为了保证克隆效率，加入总体积应不超过反应体系体积的 1/5，最高不能超过 1/3。

04 重组反应

1. 根据公式计算重组反应所需 DNA 量。

若线性化载体与插入片段浓度过高，为了确保加样的准确性，可将二者做适当稀释，在配制重组反应体系时使各组分加样量不低于 1 μl 。

2. 于冰上配制以下反应体系：

组分	重组反应 ^a	阴性对照-1 ^b	阴性对照-2 ^c	阳性对照 ^d
线性化载体	X μl	X μl	0 μl	1 μl
插入片段	Y μl	0 μl	Y μl	1 μl
2 $\times$ PreMix	10 μl	0 μl	0 μl	10 μl
ddH ₂ O	to 20 μl	to 20 μl	to 20 μl	to 20 μl

a. X/Y 根据公式计算得到载体用量和插入片段用量。

b. 阴性对照-1^b 可用来确认线性化克隆载体有无环状质粒残留，推荐进行。

c. 阴性对照-2^c 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。

d. 阳性对照反应可用来排除其他实验材料及操作因素的影响。

3. 使用移液器轻轻吸打混匀（请勿振荡混匀），短暂离心将反应液收集至管底。

4. 50℃反应 30 min；降至 4℃ 或立即置于冰上冷却。

◆ 推荐在 PCR 仪等温控比较精确的仪器上进行反应，重组效率在反应 30 min 左右达到最高，反应时间不足或者太长都将会降低克隆效率。

◆ 重组产物可于-20℃存放 1 个月，待需要时解冻转化即可。

05 重组产物转化

1. 在冰上解冻克隆感受态细胞，冰上放置 15min (如：DH5 α Competent cell)

2. 取 5 μl 重组产物加入到 50 μl 感受态细胞中，轻弹管壁混匀(请勿振荡混匀)，冰上静置 15-20 min。

！重组产物转化体积最多不应超过所用感受态细胞体积的 1/10；

3. 42℃水浴热激 1-2min 后，立即置于冰上冷却 1-2 min。

4. 加入 450 μl SOC 或 LB 培养基(不添加抗生素)，37℃摇菌 30min-1h (转速 200 - 250 rpm)。

5. 将相应抗性的 LB 平板固体培养基在 37℃培养箱中预热30min。

6. 可以直接吸取100-200 μl 菌液到含有正确抗性的平板上，用无菌涂布棒涂匀。也可以12,000 rpm 离心 1 min，弃掉 350 μl 上清。用剩余 150 μl 培养基将菌体重悬，再涂布于含有正确抗性的平板上。

7. 37℃培养箱中倒置培养 12 - 16 h。

06 重组产物鉴定

◆ 过夜培养后，重组反应转化平板上形成数百个单克隆，而阴性对照反应转化平板上的克隆数应显著少于前者。

重组反应转化板 阴性对照转化板

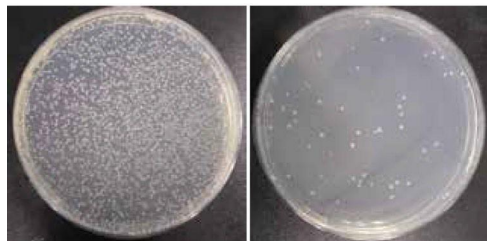


Fig 4. 过夜培养的平板

◆ 挑取重组反应转化平板上若干个克隆进行菌落PCR鉴定。若扩增插入片段的模板为与线性化载体具有相同抗性的质粒模板，扩增引物至少使用1条载体上的引物（例如通用测序引物），以便去除假阳性克隆（插入片段的质粒模板）。如果为阳性克隆，会有对应大小的DNA条带出现(Fig 5)。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 M

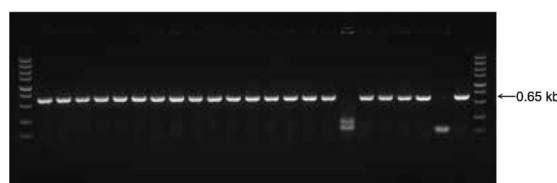


Fig 5. 菌落PCR琼脂糖凝胶电泳检测

M : DL5,000 Marker; 1 - 23: 21 个阳性克隆

◆ 菌落PCR鉴定为阳性的菌落，可再将剩余菌液接种至含有适当抗生素的液体LB培养基中培养过夜，提取质粒进行酶切鉴定(Fig 6)，或直接进行质粒测序。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

21 M

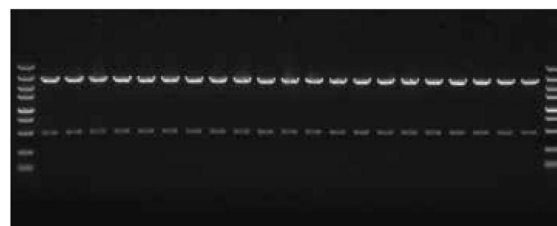


Fig 6酶切产物琼脂糖凝胶电泳检测

M: DL5,000 Marker; 1 - 21: 21 个阳性克隆

注意事项

1 重组产物冰上冷却后，可直接转化化学感受态细胞，进行转化时，重组产物转化体积最多不应超过所用感受态细胞体积的 1/10。

2 重组试剂盒可高效克隆 50 bp - 10 kb 片段。

3 载体和插入片段的使用方式

(1) 当进行小片段(<5kb)克隆时：

● 酶切制备的线性化载体，可以通过加热失活内切酶（绝大多数内切酶适用，具体失活方式参见内切酶使用说明书）后直接用于重组反应。

● 反向 PCR 扩增制备的线性化载体，如扩增模板经预线性化处理且PCR 产物电泳条带单一，扩增产物可以无需纯化直接用于重组反应。

● 对于插入片段，若琼脂糖凝胶电泳检测结果显示扩增产量足够且条带特异，同时扩增模板不是与克隆载体抗性相同的环状质粒，扩增产物可以无需纯化直接用于重组反应。不同情况下线性化载体与插入片段的使用方法可查阅 Table 1 / Table 2。

● 直接使用酶切产物或扩增产物进行重组反应时，使用体积不应超过 4ul（重组反应总体积的 1/5），最高不能超过 1/3，加入体积增大会降低克隆效率。

(2) 当进行大片段(>5kb)克隆时：

推荐使用高质量的胶回收试剂盒对线性化载体和片段扩增产物进行纯化，提高载体和插入片段的纯度。

4 产品为 2× Mix形式，虽然经测试反复冻融 20 次，仍保留 80%活性，但强烈建议分装成 5 次小份组，-20 度保存，避免反复冻融造成活性损失。

Table 1. 线性化载体的使用方法

线性化载体制备方式		模板类型	快速实验方案	最佳实验方法
酶切消化制备		环状质粒	加热失活内切酶后直接使用	胶回收
PCR 制备	扩增特异	环状质粒	DpnI 消化后直接使用 (降解扩增模板)	胶回收或者 DpnI 消化后胶回收
		预线性化质粒	直接使用	胶回收
	有明显非特异性扩增	胶回收		

Table 2. 扩增产物的使用方法

插入片段 PCR 扩增情况	PCR 模板类型	快速实验方案	最佳实验方案
扩增特异	与克隆载体抗性相同的环状质粒	DpnI 消化后直接使用 (降解扩增模板)	胶回收或者 DpnI 消化后胶回收
	线性化质粒、基因组、cDNA	直接使用	胶回收
有明显非特异性扩增	胶回收		

09 常见问题与解决方案

◆ 引物如何设计？

1. 引物设计：按照说明书的设计原则设计引物。
2. 载体的线性化方式有三种：双酶切、单酶切、反向 PCR，优先选择双酶切。
3. 引物三部分：同源臂(15 - 20 bp，不计算酶切位点和残留碱基，GC 含量 40-60%) + 酶切位点（根据实验需求保留或者舍弃）+ 特异性引物（引物 Tm 值的计算不包括同源臂的序列）。

◆ 平板上未长出克隆或克隆数目很少。

1. 引物设计不正确：确保引物包含 15-20 bp 同源臂（不计算酶切位点），GC 含量 40-60%。
2. 线性化克隆载体和插入片段扩增产物的使用量不足 / 过量，或者比例不佳：尽量按照说明书中推荐的量和比例配制重组反应体系。
3. 载体和插入片段中的其它组分抑制重组反应：未纯化 DNA 使用体积不应超过 4ul（即反应体系体积的 1/5，最高不超过 1/3）；建议线性化载体、PCR 产物进行凝胶回收纯化，纯化产物溶解在 ddH₂O 中。
4. 感受态细胞效率低：感受态细胞的转化效率需大于 10⁷ cfu/μg。可进行简单检测，转化 1 ng 质粒，取 1/10 进行涂板，生长 1000 个菌斑，估算转化效率为 10⁷ cfu/μg；重组产物的转化体积不应超过感受态细胞体积的 1/10，否则会降低转化效率；需尽量选择克隆用感受态细胞（如 DH5a、XL 10、Top10 等），不能选择表达感受态细胞（某些表达感受态会大大降低质粒转化成功率）。

◆ 多数克隆不含插入片段或含有不正确的插入片段或含插入片段的阳性克隆不是目的克隆载体

1. 插入片段 PCR 产物含有非特异扩增产物：优化插入片段 PCR 体系，提高特异性；胶回收 PCR 产物；鉴定更多的克隆。
2. 克隆载体线性化不完全：可通过不加重组酶的阴性对照检测载体是否线性化完全；酶切

法制备线性化克隆载体时优化酶切体系，可以提高限制性内切酶使用量，延长酶切反应时间，胶回收纯化酶切产物来提高酶切效果；反向 PCR 法制备线性化克隆载体时，可以利用酶切后的质粒作为 PCR 模板，尤其是 PCR 扩增模板为环状质粒时，强烈建议利用限制性内切酶DpnI 处理 PCR 产物，去除质粒模板。

3. 含插入片段的阳性克隆不是目的克隆载体：当 PCR 扩增插入片段时，若使用模板为相同抗性的质环状质粒，残留的质粒模板产生的假阳性克隆的菌落 PCR 也可以扩增出目的条带。建议插入片段 PCR 产物进行 Dpn I 消化处理，或者对扩增产物进行胶回收纯化，或者利用线性化克隆载体的插入位点两侧的一条载体特异性引物和一条插入片段特异性引物进行菌落 PCR。

◆ 菌落 PCR 无条带。

1. 引物不正确：推荐使用载体的通用引物进行菌检，或至少使用一条通用引物。
2. PCR 体系或程序不合适：没有目的条带也没有空质粒条带，建议优化 PCR 体系、程序；或者提取质粒，以质粒做模板 PCR 验证；或者进行酶切验证。
3. 重组失败：只有空质粒的条带，说明重组不成功，载体线性化不完全，建议优化酶切体系。

