

产 品 说 明 书

产品名称: Gib-XXL Fast Seamless Cloning Kit

产品货号: XKL0613

产品规格: 50 rxns

产品组分

组分	50 rxns
Fast Fusion Cloning Mix (2×)	250 μL
Control Plasmid, linearized (50 ng/μL)	5 μL
500 bp Control Fragment (50 ng/μL)	5 μL

注: 微量体积试剂请在正式实验开始前进行瞬时离心操作

储存条件

-20 °C 保存 12 个月, 避免反复冻融。

产品介绍

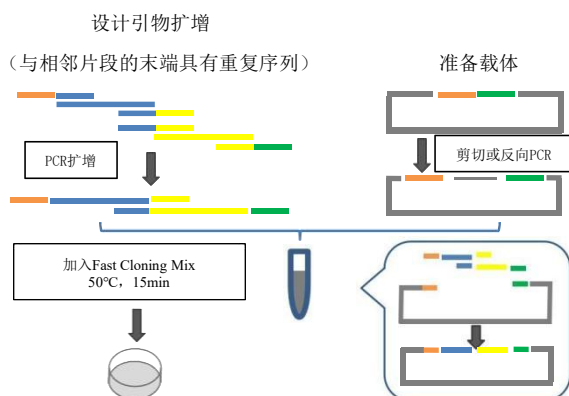
欣凯莱无缝克隆是基于同源重组原理开发的一款简单、快速、高效的无缝克隆试剂盒, 能够将任意含有载体末端重叠区域的 DNA 片段重组至线性化载体上, 不受酶切位点限制, 载体自连背景极低。该方法的实现需要在插入片段正/反向 PCR 引物的 5' 端引入线性化载体上的 15~25 nt 末端序列, 通过重组酶的作用使得具有重叠区域的片段和载体最快在 50°C 5 min 内重组, 完成无缝克隆。

产品特点

1. 简单、快速、高效, 可将插入片段 5~60 min 克隆至任意线性载体的任意位点;
2. 不依赖于连接酶, 无载体自连, 阳性率可达 95% 以上;
3. 无需考虑插入片段自身携带的酶切位点;
4. 可同时实现 1~5 个 DNA 片段的重组, 试剂中添加的辅助因子和优化的反应体系使产品具有更高的阳性率和兼容性。

使用方法

流程概要图:



一. 制备线性化克隆载体

选择合适的克隆位点, 对载体进行线性化, 线性化载体可以通过酶切或者反向 PCR 扩增完成。

(1) 酶切制备

双酶切: 线性化完全, 转化背景 (假阳性克隆) 低;

单酶切: 线性化程度差, 可通过适当延长酶切时间来减少环状质粒的残留。

注: (1) 双酶切无需去磷酸化, 单酶切需要去磷酸化;

(2) 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) 反向 PCR 扩增制备

载体质粒 DNA 为模板, 克隆位点为分界点, 设计一对反向引物, 推荐使用高保真 PCR Mix (XKL0201) 进行扩增。

二. 设计插入 PCR 引物片段

PCR 引物的 5' 端必须包含与其相邻片段 (插入片段或载体) 末端同源的 15~25 nt (推荐 18 nt) 序列。假如载体为粘性末端, 且 3' 端突出, 则引物设计必须包含突出部分; 若 5' 端突出, 则引物设计可以包含突出部分, 也可以不包含。

插入片段扩增引物:

5'—上游载体末端同源序列+酶切位点 (可选)+基因特异性正向扩增序列—3'

3'—基因特异性反向扩增序列+酶切位点 (可选)+下游载体末端同源序列—5'



注: 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

三. 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%。

四. 无缝克隆反应

1. 冰水浴中配制以下反应体系：

组分	反应体系	阴性对照	阳性对照 (如有必要)
Fast Fusion Cloning Mix (2×)	5 μL	5 μL	5 μL
线性化载体 ¹	50-200 ng	50-100 ng	1 μL
插入片段 ²	50-200 ng	-	1000 bp, 1 μL
ddH ₂ O	To 10 μL		

1 最适载体用量 (ng) = 0.02 × 载体碱基数，即 0.03 pmol。

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

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。

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。

2. 将反应体系置于 50°C，插入 1~2 个片段，反应 5-15 min；插入 3~5 个片段 50°C，15~30 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) 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；

(3) 50 °C 反应完成后，建议进行瞬时离心，将反应液收集至管底。

3. 将反应液离心管置于冰水浴中冷却，直接进行转化或储存于 -20 °C。

注：-20 °C 储存的重组产物，建议在 1 周内使用。

五. 克隆产物转化

在 100 μL 感受态细胞中加入 5-10 μL 反应液，轻柔吹吸混匀，置于冰上 25 min。42°C 热激 45 s，冰浴 2 min。向离心管中加入 700 μL 不含抗生素的无菌培养基 (2×YT 或 LB)，37°C 振荡培养 40-60 min (200 rpm)。将菌液均匀涂布在含相应抗生素的平板上，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。

六. 阳性克隆检测

菌落 PCR 鉴定：挑取单菌落置于 10 μL ddH₂O 中混匀，95 °C 裂解 10 min，取 1 μL 作模板，进行菌落 PCR 鉴定，推荐使用 2×XK Taq PCR mix (Colony) (XKL0213)。

酶切鉴定：将单菌落接种到抗性培养基中培养过夜，提取质粒进行酶切鉴定。

注意：(1) 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；

(2) 必要时可进一步对阳性结果进行测序鉴定。

问题描述	可能原因	解决方法
转化效率低	感受态效率低下	使用新制备或妥善保存的感受态细胞。
	DNA 片段比率不佳	按照说明书推荐的最适用量和比率配制反应体系。常用的吸光测量法易受 DNA 纯度、缓冲液 pH 值等因素影响，测定偏差较大，因此推荐使用琼脂糖电泳测定样品浓度。
	DNA 片段纯度不够	对载体和插入片段进行胶回收纯化。由于 EDTA 等金属离子螯合剂会抑制无缝克隆反应，因此纯化产物应溶解于 ddH ₂ O 中，切勿使用 Tris-EDTA 等缓冲液。
	反应产物过量	在转化体系中，无缝克隆反应产物体积不应超过感受态细胞体积的 10%。
大量克隆不含插入片段	载体线性化不完全	酶切制备线性化载体时，提高限制性内切酶使用量，延长反应时间，或使用胶回收纯化酶切产物。
	相同抗性质粒污染	以质粒为模板进行插入片段 PCR 扩增时，使用预线性化质粒作为扩增模板，使用 DpnI 等甲基化敏感性内切酶对扩增产物进行处理，或对产物进行胶回收纯化。
	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。