

## One Step Seamless Cloning kit

地址：武汉市新技术开发区高新大道 666 号 2 栋  
 电话：15572895186（微信同号）  
 网址：[www.keepbio.cn](http://www.keepbio.cn) 技术 QQ：781634607

### 使用说明书

包装量：

目录编号	包装单位
CV1901	20 次

Components	CV1901
2 × OneStep Cloning Mix	50 $\mu$ l × 2

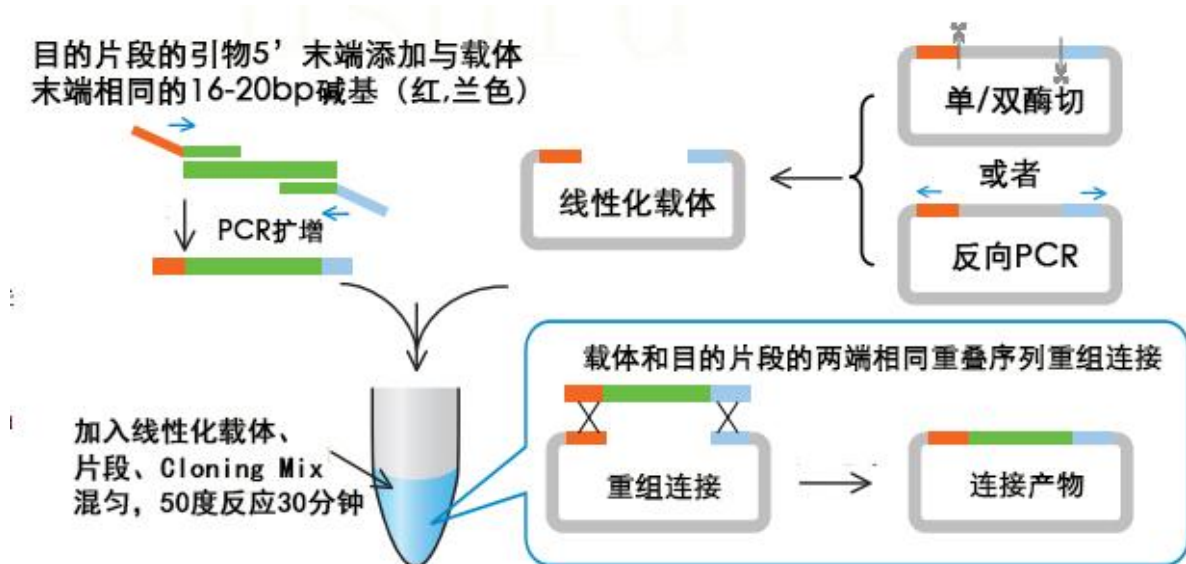
**产品储存：** -20 $^{\circ}$ C 保存，避免多次反复冻融

**制品说明：** 一步法无缝克隆试剂盒不依赖于 T4 连接酶，不受载体和目的片段的酶切位点限制，而直接用重叠片段重组的方法，采用特殊的酶组合可以将任意方法线性化后的载体和与其两端具有 16-25bp 重叠区域的 PCR 片段定向重组连接，可以 30 分钟内实现 A 末端或者平末端 PCR 产物片段高效定向无缝克隆至载体的任意位点。

**产品特点：**

1. 30分钟可？  
 将一个50bp-15kb PCR扩增片段（平末端、A末端均可）克隆插入任意载体的任意位置。
2. 不受载体和插入片段酶切位点的可用性和平末端/粘性末端的限制，可以在任意位点进行克隆。
3. 无缝克隆，插入点不会引入不需要的碱基序列。
4. 不依赖于连接酶及磷酸酶，高效，准确，克隆阳性率可达95%以上。

科尔普一步法无缝克隆试剂盒原理示意图：



## 线性化载体和插入DNA片段的制备:

### A: 线性化载体的制备

(1). 酶切来源: 酶切所得线性载体, 平末端或者粘端、单酶切或者双酶切均可, 酶切后胶回收。

注: 一步法无缝克隆反应体系内无DNA连接酶, 不会发生载体自连反应。因此, 即使是以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)是由酶切不完全未线性化环状载体转化而形成的。我们推荐酶切后胶回收可以把这种未线性化载体比例降低到最低程度。

(2). 反向PCR来源: 建议使用 $pfu$ (货号: PC0302)系列高保真DNA聚合酶制备, 如果扩增条带单一可以通过PCR产物纯化(货号: DR0201)获得载体, 否则通过胶回收(货号: DR0101)获得载体。

注: 反向PCR的质粒模板也是非线性化载体, 也可能导致假阳性克隆(无插入片段), 因此PCR来源线性载体(PCR产物)纯化前用Dpn I内切酶消化质粒模板, 可以降低背景, 提高阳性率。但是一般情况下, 经过胶回收已经足以把这种未线性化载体比例降低到最低, 因此反向PCR来源的线性化载体我们也推荐胶回收。

### B: 插入DNA片段的制备

(1). 一步法无缝克隆引物设计总的原则是: 通过在引物5'端引入线性化克隆载体末端同源序列, 使得插入片段扩增产物5'和3'最末端分别带有和线性化克隆载体两末端对应的完全一致的序列(16 bp~20 bp)。

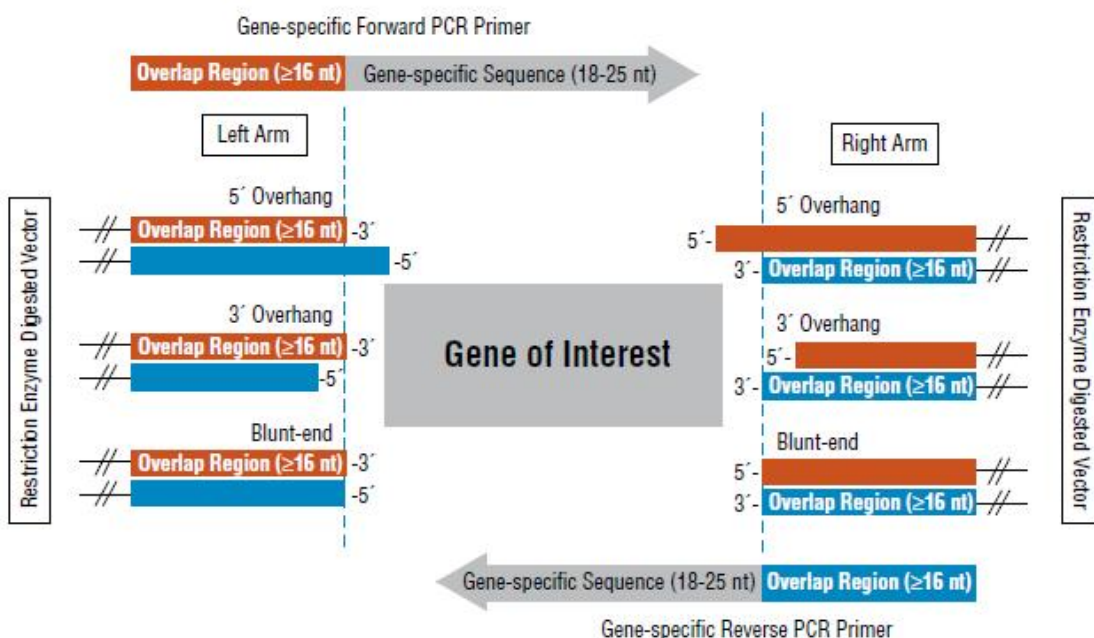
(2). 插入片段引物设计: 克隆引物包括插入片段特异性引物序列和重叠序列。

克隆正向引物(5'-3'): 线性载体正向 $\geq 16$  nt重叠区序列(3'末端算起)+插入片段正向特异引物序列(18-25 nt)

克隆反向引物(5'-3'): 线性载体反向 $\geq 16$  nt重叠区序列(3'末端算起)+插入片段反向特异引物序列(18-25 nt)

**注意:** 重叠区的碱基数至少16 bp, 并且Tm值需要 $> 48^{\circ}\text{C}$ (AT pair =  $2^{\circ}\text{C}$  and GC pair =  $4^{\circ}\text{C}$ ), 否则可延长碱基数目直到符合要求。

按照线性载体末端的结构(5'突出, 3'突出, 平末端), 引物设计也分3种情况, 示意如下:



线性化载体的两端因线性方式(如单酶切、双酶切、反向PCR)不同, 可以是以上三种末端结构的两两任意

组合，插入片段特异性引物设计的原则遵循一般引物设计的原则即可。

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  $T_m$  值，载体末端同源序列不应参与计算。

(3). 酶的选择：建议使用pfu系列高保真DNA聚合酶。

(4). 反应条件：一般按照具体使用的聚合酶说明书进行即可。

(5). 纯化插入片段

- **可选：**如果片段来源于质粒模板，且该质粒与重组载体具有相同抗性，纯化前用Dpn I内切酶消化质粒模板，可降低背景，提高阳性率。
- 如果片段单一，则建议用PCR产物纯化试剂盒（货号：DR0201）纯化片段。
- 如果有非特异扩增，则建议用胶回收试剂盒（货号：DR0101）回收片段。
- 使用该方法克隆，用来线性化载体的酶切位点在拼接的时候会缺失，如果对酶切位点有严格要求的，建议注意酶切位点的选择，必要时可在正反向克隆引物的重叠区序列和特异基因序列之间增加缺失掉的碱基来恢复原有酶切位点（见后面举例说明）。
- 如果重组质粒用于蛋白表达，则在引物设计时注意读码框，蛋白表达及纯化所需序列（如启动子，RBS序列，起始密码子，终止密码子，蛋白标签等）不被破坏。

正向引物设计举例说明（EcoR I 酶切开）：



如上图，载体由Ecor I 酶切开，形成5' 突出末端：

根据上述设计原则，从3' 端开始计算，往回算16bp-20bp（本举例采用了16bp末端重叠相同序列），加到目的片段特异引物序列前面即可。

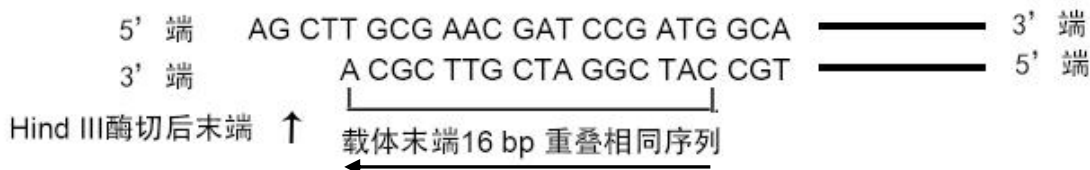
正向引物具体如下：5'— GCT AGC GAA TTG GCC G NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN —3'

**注意：**以上引物设计完成克隆连接后，EcoR I 酶切位点将会消失（不保留酶切位点）。

如果需要保留 EcoR I 酶切位点，需要在载体末端16bp重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐缺失的EcoR I 识别位点序列aattc，完成克隆连接后，EcoR I 酶切位点依然存在（保留酶切位点）。

具体如下：5'— GCT AGC GAA TTG GCC G aattc NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN —3'

反向引物设计举例说明（Hind III 酶切开）：



如上图，载体由Hind III 酶切开，形成5' 突出末端：

根据上述设计原则，从3' 端开始计算，往回算16bp-20bp（本举例采用了16bp末端重叠相同序列），加到目的片段特异引物序列前面即可。

反向引物具体如下：5'— CAT CGG ATC GTT CGC A NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN —3'

**注意：**以上引物设计完成克隆连接后，Hind III 切位点将会消失（不保留酶切位点）。

如果需要保留 Hind III 酶切位点，需要在载体末端16bp重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐缺失的

Hind III 识别位点序列agctt，Hind III 酶切位点依然存在（保留酶切位点）。

具体如下：5'— CAT CGG ATC GTT CGC A agctt NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN —3'

### 无缝克隆反应的操作步骤：

**注意：**2 × OneStep Cloning Mix 含有连接增强剂PEG很粘稠，从冰箱拿出来温度低时更粘稠，可以放在手心化冻几分钟提高温度便可降低粘稠度（不影响质量），轻弹混匀，瞬间离心收集到管底。

1. 按照下表建立反应体系（可使用PCR管在室温配制）

2 × OneStep Cloning Mix	5 μl
Linear Vector (10-80 ng)	X μl*
Insert	Y μl*
dd H <sub>2</sub> O	To 10 μl

\* 载体一般用20-50 ng，插入片段与载体的摩尔比在2:1-3:1之间最佳；如果插入片段小于200bp，插入片段与载体的摩尔比用5:1。

2. 轻轻混匀，在50°C反应30分钟（可在PCR仪器上进行），反应结束后，将PCR管置冰上后直接转化或者保存于-20°C。较短片段例如100bp-1kb只需要15分钟便能获得足够转化子，较长片段的连接，可以延长反应时间到60分钟。
3. 取5 μl 反应产物按照感受态细胞说明书进行转化（如果转化子较少，可以将所有的产物转化并将所有的转化液涂板）。

### 阳性克隆的鉴定：

可根据具体情况，选择菌落PCR鉴定，提取质粒（货号PL0103）进行限制性内切酶鉴定或测序鉴定。