

Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒)

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|--------------------------------|------|
| D7010S | Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒) | 20次 |
| D7010M | Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒) | 100次 |

产品简介:

- 碧云天生产的Seamless Cloning Kit(无缝克隆试剂盒)是一种新型的基于插入片段和线性化载体的末端进行同源重组的基因克隆试剂盒。本试剂盒利用包含了DNA 5'外切酶(5' Exonuclease)、DNA聚合酶(DNA Polymerase)和DNA连接酶(DNA Ligase)活性的重组酶(assembly enzyme),通过同源重组的方法可以将一个或多个DNA片段按照预定方向、快速、高效和精确地插入到线性化载体中,并且最终构建的克隆没有任何额外的碱基序列,因此被称作“无缝克隆”。
- 和传统的基因克隆方法相比,本试剂盒的无缝克隆方法有多方面的突出优点:(1) 最终构建的克隆没有任何额外的碱基序列,因此是真正的“无缝克隆”;(2) 可通过一个反应将一个或多个片段快速、定向地插入到载体的任何位置;(3) 待插入的PCR扩增产物无须酶切;(4) 插入片段的大小范围宽,从20bp左右的小片段到10kb左右的大片段都可以成功插入;(5) 可通过PCR扩增获得线性化载体,因此限制性内切酶消化并不是克隆所必须的;(6) 酶催化的重组连接反应非常快速和高效,对于一个片段的插入仅需50°C处理15分钟;对于三个片段的插入仅需50°C处理30分钟,而对于5个片段的插入也仅需50°C处理约60分钟;(7) 只有插入片段和线性化载体的末端才能发生同源重组,可以有效避免非特异性的同源重组;(8) 阳性克隆比例高,单个DNA片段克隆的阳性率几乎为100%,三个片段的克隆阳性率约为70-80%。
- 本无缝克隆试剂盒操作非常简单。本试剂盒进行基因克隆时没有酶切位点的限制,仅需在载体的预定克隆位点通过酶切进行线性化或通过PCR的方法直接制备线性化的载体,在插入片段的两个PCR引物的5'端引入与载体克隆位点两端完全一致的15~25bp的重叠序列。重组反应可以在50°C快速进行,3-4小时内即可完成从DNA样品的PCR扩增、纯化、重组、到转化涂板的全部操作。其中PCR反应约2-3小时,PCR产物纯化约20分钟,重组反应15分钟,转化涂板约40分钟,共计约3-4小时即可完成。
- 碧云天无缝克隆试剂盒的工作原理示意图请参考图1。

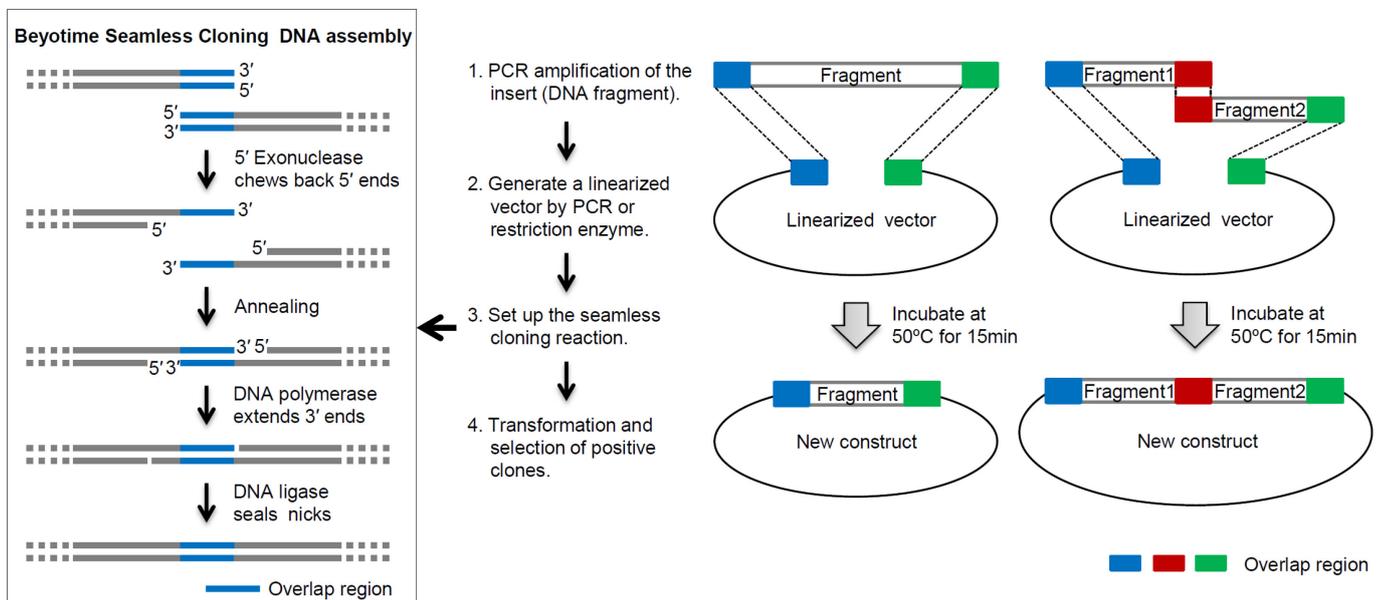


图1. 碧云天无缝克隆试剂盒的工作原理图。重叠区域(overlap region)的DNA序列完全一致,通常长度为15-25bp。不同颜色的重叠区域代表不同的重叠序列。在插入2个或以上片段时,不同的重叠序列可以确保待插入片段有序地插入到线性化的载体(linearized vector)中。

- 本试剂盒中提供的linearized pUC18为通过EcoRI和BamHI双酶切制备。为检测本试剂盒的连接效率,试剂盒还提供了一个1100bp的DNA fragment,可通过使用pUC18的通用测序引物(M13 forward sequencing primer (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')和M13 reverse sequencing primer (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'))对连接转化后的克隆进行菌落PCR扩增,扩增后得到1300bp的片段的克隆则为阳性克隆,而扩增后得到200bp的片段的克隆则为阴性克隆。
- 本试剂盒用于一个1100bp片段的克隆和三个不同的1100bp片段的克隆,其重组反应产物转化DH5 α 感受态细胞后涂板获得的

LB平板的实测效果参考图2A，菌落PCR鉴定结果参考图2B。

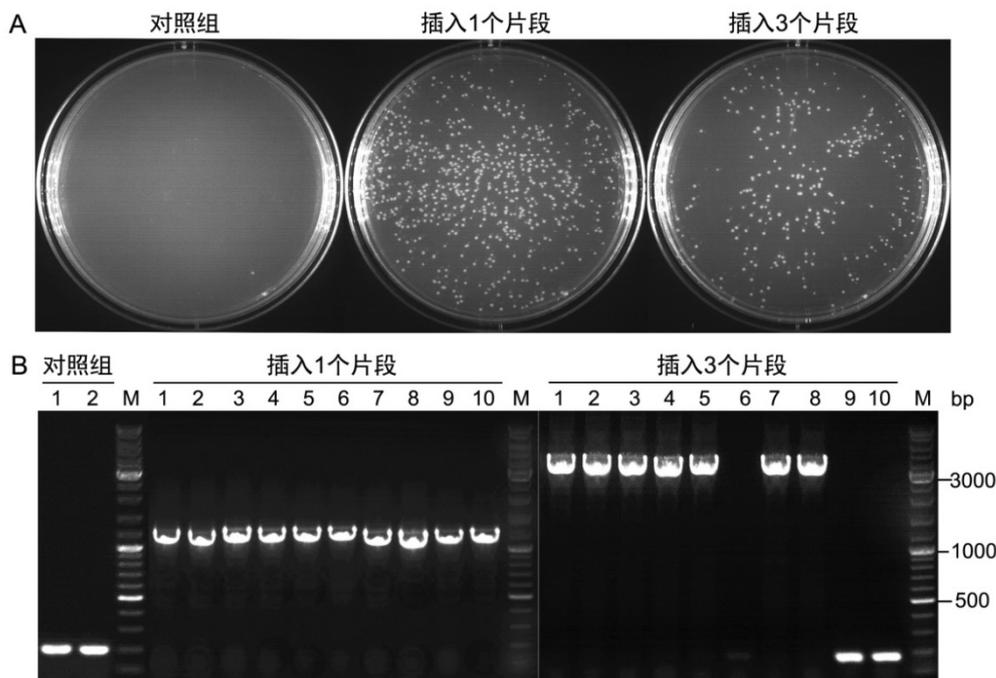


图 2. 本试剂盒用于无缝克隆的实测效果。 A. 本试剂盒反应产物转化感受态细菌 DH5 α 后涂板获得的 LB 平板效果图。在 20 μ l 反应体系中，将 EcoRI 和 BamHI 双酶切线性化的载体 pUC18 (Linearized pUC18)，与通过 PCR 扩增的含有重叠序列的插入片段(DNA fragment, 1100bp)混合(pUC18 载体与 PCR 片段的摩尔比为 1:3); 或者与 3 个有适当重叠序列的不同的 1100bp 片段混合，pUC18 载体与 PCR 片段的摩尔比为 1:1:1:1，然后加入 10 μ l 的 2X Seamless Cloning Mix，并用水补至 20 μ l，50 $^{\circ}$ C 反应 15min(插入一个片段)或 30min(插入三个片段)。反应结束后，将反应产物放置在冰上 5min，取 5 μ l 转化到 100 μ l 的 DH5 α 感受态细菌中。对照组中只加入线性化的载体 pUC18，同时也在 50 $^{\circ}$ C 反应 15min。实验结果表明，插入片段数目越多转化后得到的克隆数越少。B. 菌落 PCR 鉴定用本试剂盒构建得到的克隆。实验结果表明，插入 1 个片段时的阳性率基本上为 100%，插入 3 个片段时的阳性率约为 70%左右。菌落 PCR 使用的是 pUC18 的通用测序引物 M13 forward sequencing primer (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')和 M13 reverse sequencing primer (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')。

包装清单：

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|--------------------------------------|-------------|
| D7010S-1 | 2X Seamless Cloning Mix | 200 μ l |
| D7010S-2 | Linearized pUC18 (25ng/ μ l) | 6 μ l |
| D7010S-3 | DNA fragment (1100bp, 30ng/ μ l) | 6 μ l |
| D7010S-4 | Nuclease free water | 200 μ l |
| — | 说明书 | 1份 |

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|--------------------------------------|------------|
| D7010M-1 | 2X Seamless Cloning Mix | 1ml |
| D7010M-2 | Linearized pUC18 (25ng/ μ l) | 20 μ l |
| D7010M-3 | DNA fragment (1100bp, 30ng/ μ l) | 20 μ l |
| D7010M-4 | Nuclease free water | 1ml |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件：

-20 $^{\circ}$ C保存，一年有效。

注意事项：

- 单个片段的PCR产物进行重组反应时，如果PCR条带单一，可以无须纯化并直接进行重组反应，但PCR产物的体积不得超过重组反应体系的20%，并且重组效率通常会低于纯化后的PCR产物。
- 对于多个片段的重组反应，重组效率通常会低于单个片段的重组效率，建议胶回收纯化后再进行重组反应。对于3个以上片段的重组反应或重组片段大于5kb时，强烈建议在胶回收后再进行重组反应。通常胶回收后，重组效率可提高2-10倍。
- 单片段和线性化载体重组时，摩尔比至少为2:1。多片段和线性化载体重组时，各个片段和线性化载体的摩尔数宜保持一致。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

➤ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 线性化载体的制备

载体的线性化可以在目标载体上选择合适的位点进行双酶切或单酶切，并对酶切后的载体进行琼脂糖凝胶电泳和切胶纯化(例如碧云天的D0056, DNA凝胶回收试剂盒)。也可通过在质粒插入位点的左右两侧设计方向相反的引物进行PCR，以获取线性化载体。PCR扩增获得的线性化载体，也需要琼脂糖凝胶电泳和切胶纯化。同时需要注意如下事项：

- 为了降低载体自连背景，提高阳性率，建议采用双酶切的方法对载体进行线性化。载体单酶切容易造成载体切割不完全和自连，导致假阳性的产生。
- 酶切后无论是5'端突出、3'端突出还是平末端都可以用于本试剂盒，但由于重组过程中会产生3'端突出末端，因此酶切后形成3'端突出或平末端的假阳性率会更低一些。
- 通过酶切获得线性化载体的情况，线性化载体上的重叠序列只能用酶切后的3'端序列进行计算。特别是对于酶切后产生5'端突出的情况，不能以5'端突出部分计算重叠序列，因为重组反应时有DNA 5'外切酶(5' Exonuclease)活性，会消化掉5'端序列。
- 酶切较长时间，例如酶切3小时以上或酶切过夜，可有效降低载体未切开或自连导致的背景
- 通过PCR方法获得线性化载体时，建议在PCR后使用DpnI (例如碧云天的D6257)进行消化，以消除模板质粒对于后续获取重组质粒的干扰。或者在PCR之前宜先通过双酶切进行线性化处理，以消除模板导致的假阳性克隆。
- PCR扩增获取线性质粒时，宜使用高保真的DNA聚合酶，例如碧云天的BeyoFusion™ DNA Polymerase (D7220, D7221)，BeyoFusion™ DNA Polymerase (D7222, D7222B)或Pfu DNA Polymerase (D7216, D7217)。

2. 待插入片段的制备

- 如果待插入片段是非常小的片段，例如20-70bp，可以通过单链DNA(常被称为引物)的合成和退火进行制备；如果待插入片段的长度比较长不能直接进行合成，可以通过PCR扩增的方法进行制备。
- 无论是合成退火还是PCR扩增获得的待插入片段，在其两侧必须含有15-25bp序列与拟连接的载体或DNA片段完全重叠，后续重叠区域会发生重组，从而获得预期的重组质粒(参考图1)。
- 通过PCR扩增获得待插入片段时，可以在设计引物时在两条引物的5'端加上与拟连接的载体或DNA片段上完全重叠的15-25nt的序列。引物设计的要求和普通的引物设计要求相同，需要适当避免引物自身的二级结构、形成引物二聚体和GC含量过高等；并且在引物的5'端加上15-25nt后，仍然要求整条序列适当避免自身的二级结构、二聚体和GC含量过高等。
- 插入单个片段的引物设计方法可以参考图3。图3A中给出了常规的无缝克隆的引物设计方法实例的示意图，获得的克隆完全是无缝的。图3B中给出了保留插入位点两侧酶切位点的引物设计方法实例的示意图，获得的重组克隆可以保留两侧的酶切位点，以便于后续的酶切鉴定或者亚克隆等。

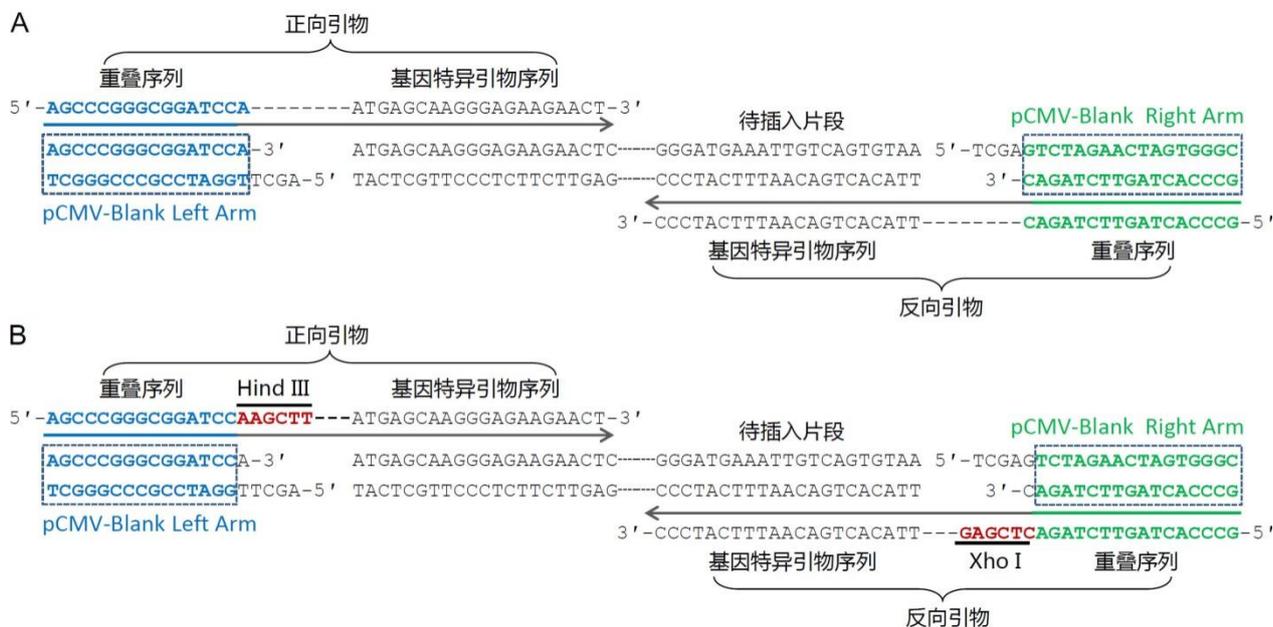


图3. 使用本试剂盒把单个片段插入到载体中的引物设计实例示意图。A. 目的序列插入到pCMV-Blank (D2602)载体中的无缝克隆引物设计示意图。pCMV-Blank用HindIII和XhoI双酶切线性化。选取图中所示的包含了重叠序列和基因特异引物序列的引物用于PCR扩增待插入片段，PCR产物切胶回收后与线性化的pCMV-Blank使用本试剂盒进行重组反应。B. 目的序列插入到pCMV-Blank载体中并保留酶切位点的引物设计示意图。pCMV-Blank用HindIII和XhoI双酶切线性化。选取图中所示的包含了重叠序列、酶切位点和基因特异引物序列的引物用于PCR扩增待插入片段，PCR产物切胶回收后与线性化的pCMV-Blank使用本试剂盒进行重组反应。前者的优点在于引物设计简单，可以实现无缝克隆，后者的优点在于多了两个酶切位点，便于后续的酶切鉴定或亚克隆。此外，如果计划使用本试剂盒把目的片段克隆到碧云天的pCMV系列质粒中，上图中的重叠序列可以参考使用。

e. 插入多个片段的引物设计方法可以参考图4。通常可以先列出所需克隆片段的序列，标注出片段之间的相邻处，从相邻处挑选15-20bp作为重叠序列。重叠序列的挑选需要满足常规的引物设计要求，即需要适当避免引物自身的二级结构、形成引物二聚体和GC含量过高等。重叠序列可以仅在一个插入片段中(图4中红色DNA序列)，也可以分布在两个片段中(下图蓝色DNA序列)。重叠序列宜尽量设计为8个G或C和8个A或T，同时使退火温度不低于48°C (以AT配对为2°C，GC配对为4°C进行粗略计算)。随后利用重叠序列和基因特异的序列来设计相应的PCR引物，每个片段单独扩增后，所获得的PCR产物经琼脂糖凝胶电泳和切胶纯化即可用于本试剂盒的重组反应。

1. 待插入的三个DNA片段序列。

Fragment 1: ATGAGCAAGGGAGAAGA...TCGGGATGAAATTGTCAGTG
TACTCGTTCCTCTTCTTGA...AGCCCTACTTTAACAGTCAC

Fragment 2: ATGATCCTCGACACTGACTAC...GGCAGAGCTATGAAGGAGGCT
TACTAGGAGCTGTGACTGATG...CCGTCTCGATACTTCTCCGA

Fragment 3: ATGTAAAAGAGCCCGAGAGAG...TGAAGCCGAAGGGAACTTGA
TACATTTTCTCGGGCTCTCTC...ACTTCGGCTTCCCTTGA

2. 将两个相邻插入片段的相邻处用竖线标记，并挑选15-20bp作为重叠序列(虚线框中的序列)。

ATGAGCAAGGGAGAAGA...TCGGGATGAAATTGTCAGTG | ATGATCCTCGACACTGACTAC...GGCAGAGCTATGAAGGAGGCT | ATGTAAAAGAGCCCGAGAGAG...TGAAGCCGAAGGGAACTTGA
TACTCGTTCCTCTTCTTGA...AGCCCTACTTTAACAGTCAC | TACTAGGAGCTGTGACTGATG...CCGTCTCGATACTTCTCCGA | TACATTTTCTCGGGCTCTCTC...ACTTCGGCTTCCCTTGA

3. 设计PCR引物(引物均从重叠区的5'端开始)

Forward primer for fragment 1: ATGAGCAAGGGAGAAGA...TCGGGATGAAATTGTCAGTG
Reverse primer for fragment 1: TACTCGTTCCTCTTCTTGA...AGCCCTACTTTAACAGTCAC

Forward primer for fragment 2: ATGATCCTCGACACTGACTAC...GGCAGAGCTATGAAGGAGGCT
Reverse primer for fragment 2: TACTAGGAGCTGTGACTGATG...CCGTCTCGATACTTCTCCGA

Forward primer for fragment 3: ATGTAAAAGAGCCCGAGAGAG...TGAAGCCGAAGGGAACTTGA
Reverse primer for fragment 3: TACATTTTCTCGGGCTCTCTC...ACTTCGGCTTCCCTTGA

4. 获得的PCR扩增片段。

Fragment 1: ATGAGCAAGGGAGAAGA...TCGGGATGAAATTGTCAGTG
TACTCGTTCCTCTTCTTGA...AGCCCTACTTTAACAGTCAC

Fragment 2: ATGATCCTCGACACTGACTAC...GGCAGAGCTATGAAGGAGGCT
TACTAGGAGCTGTGACTGATG...CCGTCTCGATACTTCTCCGA

Fragment 3: ATGTAAAAGAGCCCGAGAGAG...TGAAGCCGAAGGGAACTTGA
TACATTTTCTCGGGCTCTCTC...ACTTCGGCTTCCCTTGA

■ Overlap region of 5' end with vector ■ Overlap region of 3' end with vector

图4. 使用本试剂盒把3个片段插入到线性化载体中的引物设计实例示意图。如果需要插入更多的片段，可以参考上述实例示意图进行。

3. 取出试剂盒的4个组分，Nuclease free water置于室温，其余置于冰上。参考下表配制如下反应体系：

| 插入片段 | 1-2个片段 | 3-5个片段 | 阴性对照 | 阳性对照 |
|-------------------------|----------|----------|----------|------------------------------------|
| 每个插入片段与载体的摩尔比 | 3:1 | 1:1 | - | - |
| 纯化的PCR片段 | 10-100ng | 10-100ng | - | 2μl DNA fragment (1100bp, 30ng/μl) |
| 线性化载体 | 50-100ng | 50-100ng | 50-100ng | 2μl Linearized pUC18 (25ng/μl) |
| 2X Seamless Cloning Mix | 10μl | 10μl | 10μl | 10μl |
| Nuclease free water | ? | ? | ? | 6μl |
| 总体积 | 20μl | 20μl | 20μl | 20μl |

a. 当插入1-2个片段时，片段和载体的摩尔比为3:1左右时，重组效率最高。

b. 当插入片段小于200bp时，建议插入片段和载体的摩尔比为5:1。

4. 上述反应体系置于50°C孵育15 min(插入1-2个片段)、30 min(同时插入3个片段)或60 min(同时插入4-5个片段)。反应完成后如不能立即进行后续操作，可将反应样品保存于-20°C。

5. 转化及克隆鉴定。

a. 取5μl上一步骤的反应样品加入到50-100μl DH5α等感受态细胞中(注意所加入的DNA样品体积不要超过感受态体积的1/10)，轻轻混匀，将该混合物置于冰上30min。

b. 42°C水浴中90秒进行热激，然后迅速放回冰浴中，静置3~5min。

c. 加入500 μl不含抗生素的SOC或LB培养液，轻轻混匀，37°C震荡培养1h。

d. 将菌液5000 rpm离心1 min以沉淀菌体。吸去大部分培养液，剩余约50-100μl的培养液，重悬菌体。然后全部均匀涂布到含适当抗生素的LB平板上，37°C培养箱中培养过夜。

e. 第二天挑取平板上的克隆进行菌落PCR或者提取质粒进行酶切鉴定，也可以直接选取数个克隆进行测序鉴定。

常见问题：

1. 转化效率低，菌落很少甚至没有

a. 为确保试剂盒正常工作，请用试剂盒提供的线性化载体和插入片段进行对照实验。

b. 引物序列设计不正确。检查引物序列，确保引物两端有15-25bp的同源臂以用于与相邻片段进行同源组装。

c. 感受态细胞对重组反应体系过敏。使用水对重组后的反应液稀释5-10倍后再进行转化。

d. PCR产物不纯或插入片段即线性化载体浓度过低。采用凝胶电泳和胶回收的方法对PCR产物和线性化载体进行纯化，严格按照说明书推荐的摩尔比和浓度进行插入片段和线性化载体的混合。在20μl总反应体系中，插入片段和线性化载体混

合后体积应尽量小于5 μ l，但如果插入片段和线性化载体用水溶解或洗脱的，体积可以不受此限制。

- e. 转化细菌时重组反应样品加入过多。确保重组反应样品的体积不超过感受态细胞体积的10%。
 - f. 感受态细胞的转化效率过低。用高效率感受态重新转化。
 - g. 选择了错误的抗生素，或在固体LB培养基中加入了过量抗生素。涂板时选择正确的抗生素和浓度。
- 2. 阳性率过低**
- a. 载体线性化不完全。建议延长酶切时间至过夜并凝胶电泳后切胶回收。
 - b. 模板质粒污染。以质粒为模版进行PCR扩增，得到的PCR产物最好经过凝胶电泳和切胶纯化，这样可以有效去除模板质粒。使用载体为模板通过PCR扩增得到线性化载体时，推荐使用DpnI酶消化以消除模板质粒的干扰。
 - c. LB平板过期或用平板配制时使用了错误的抗生素，确保使用的LB平板是1个月内配制的，并检查载体的抗性。
- 3. 阳性克隆含有错误的插入片段**
- PCR产物含有不正确的插入片段。优化PCR反应引物设计以增加PCR产物的特异性，并对PCR产物进行凝胶电泳和切胶纯化。
- 4. 平板上有很多小菌落**
- 有些外源蛋白的表达对大肠杆菌是有毒的，此时需要考虑采用低拷贝质粒进行克隆。

使用本产品的文献：

1. Qu C, Yan M, Yang S, Wang L, Yin Q, Liu Y, Chen Y, Li J. Haploid embryonic stem cells can be enriched and maintained by simple filtration. *J Biol Chem.* 2018 Apr 6;293(14):5230-5235.
2. Liu H, Huang T, Li M, Li M, Zhang C, Jiang J, Yu X, Yin Y, Zhang F, Lu G, Luo MC, Zhang LR, Li J, Liu K, Chen ZJ. SCRE serves as a unique synaptonemal complex fastener and is essential for progression of meiosis prophase I in mice. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jun 20;47(11):5670-5683.
3. Xiang T, Tang J, Li L, Peng W, Du Z, Wang X, Li Q, Xu H, Xiong L, Xu C, Le X, Wei X, Yu F, Li S, Xiao Q, Luo B, Xiang X, Huang A, Lin Y, Ren G, Tao Q. Tumor suppressive BTB/POZ zinc-finger protein ZBTB28 inhibits oncogenic BCL6/ZBTB27 signaling to maintain p53 transcription in multiple carcinogenesis. *Theranostics.* 2019 Oct 18;9(26):8182-8195.
4. Wu Y, Chen T, Liu Y, Tian R, Lv X, Li J, Du G, Chen J, Ledesma-Amaro R, Liu L. Design of a programmable biosensor-CRISPRi genetic circuits for dynamic and autonomous dual-control of metabolic flux in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jan 24;48(2):996-1009.
5. Jianlong He, Le Liu, Xiaoyan Liu, Kai Tang. Isolation and Characterization of a Novel Cold-Active, Halotolerant Endoxylanase from *Echinicola rosea* sp. Nov. *JL3085 T Mar Drugs.* 2020 May 6;18(5):245.;doi: 10.3390/md18050245
6. Yaokang Wu, Yanfeng Liu, Xueqin Lv, Jianguo Li, Guocheng Du, Long Liu. CAMERS-B: CRISPR/Cpf1 assisted multiple-genes editing and regulation system for *Bacillus subtilis* *Biotechnol Bioeng.* 2020 Jun;117(6):1817-1825.;doi: 10.1002/bit.27322
7. Pengtao Yue, Qian Lu, Zhi Liu, Tianxing Lv, Xinyue Li, Haidong Bu, Weiting Liu, Yaxiu Xu, Hui Yuan, Aide Wang. Auxin-activated MdARF5 induces the expression of ethylene biosynthetic genes to initiate apple fruit ripening *New Phytol.* 2020 Jun;226(6):1781-1795.;doi: 10.1111/nph.16500
8. Jianlong He, Xiaoyan Liu, Jun Xia, Jiaying Xu, Peng Xiong, Zhongyang Qiu. One-step utilization of non-detoxified pretreated lignocellulose for enhanced cellulolytic enzyme production using recombinant *Trichoderma reesei* RUT C30 carrying alcohol dehydrogenase and nicotinate *BIORESOURTE TECHNOL.* 2020 Aug;310:123458.;doi: 10.1016/j.biortech.2020.123458.

Version 2021.09.01