上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：021-61312973　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：shyysw@sina.com

HiFi 一步法无缝克隆试剂盒

货号：R32298

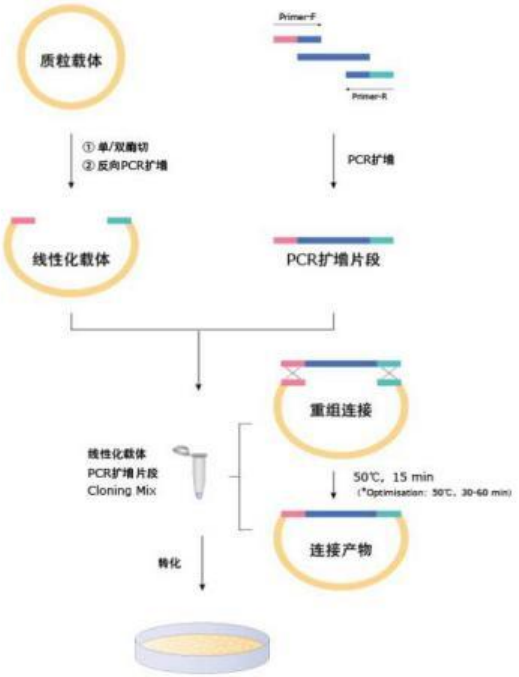
规格：20T，100T

保存温度：2-8℃保存，有效期 12 个月。

产品介绍：

本产品为升级版的无缝克隆连接反应试剂盒，专门为提高克隆效率及克隆准确性而设计。其采用优化的酶组合体系，连接反应过程中完全不引入额外的碱基序列，避免了传统分子克隆实验过程中繁琐的设计过程（引物和酶切位点的选择等）。该产品专门针对长片段的无缝连接反应进行了优化，可高效实现片段与线性化载体的定向连接克隆，不受载体平末端/粘性末端的限制和插入片段酶切位点的影响。高度优化的反应缓冲体系和增强的酶混合物，可显著提高片段连接的效率和对杂质的耐受度，极大地提高了分子克隆的效率。试剂盒中配备了 M13 Forward 和 Reserve 通用型引物，可用于含有 M13 引物位点载体的测序和鉴定，以及检测阳性对照组的阳性率。本产品适用于包含 16-25 bp 末端重叠序列的片段与载体间的快速、定向、无缝克隆。

工作原理：



产品组份：

组分	20T	50T
2×HiFi OneStep Cloning Mix	100 μL	100 μL x 5
Linearized Control Vector（3 kb 40 ng/μL）	5 μL	5 μL
Control Insert（800 bp 20 ng/μL）	5 μL	5 μL
M13 Forward Primer（10 μM）	20 μL	100 μL
M13 Reserve Primer（10 μM）	20 μL	100 μL

使用方法：

1. 线性化载体的制备

选择合适的克隆位点：尽量选择无重复序列且 GC 含量适中的区域进行克隆。载体的克隆位点上下游 20 bp 区域内 GC 含量在 40-60%之间时组装效率最大。

1）酶切制备线性化载体：单酶切或双酶切所得线性载体，平末端或粘末端，酶切胶回收线性化载体。

注：无缝克隆反应体系内无双链 DNA 连接酶，不会发生载体自连，线性化载体无需进行末端去磷酸化处理。重组产物转化后出现的假阳性克隆是由未线性化的环状载体转化而形成的，因此酶切制备线性化载体建议使用双酶切，且酶切后采用胶回收的方法回收酶切产物，有利于降低假阳性。

2）反向 PCR 扩增制备线性化载体：载体反向 PCR 推荐使用高保真酶进行载体扩增，以减少突变。PCR 产物经胶回收获得线性化载体。

注 1：反向 PCR 使用的环状质粒模板也可能导致假阳性克隆，50 μL 的 PCR 反应体系中，推荐使用 0.1 ng-1 ng 环状质粒作为模板。

注 2：PCR 产物纯化前用 Dpn I 内切酶消化环状质粒模板，可以降低假阳性克隆。但一般情况下，胶回收已经足以把这种未线性化载体比例降低到最低，因此我们推荐胶回收纯化反向 PCR 扩增获得的线性化载体。

2. 连接反应：

插入片段的制备

1） 设计扩增引物

通过 PCR 扩增制备插入片段，PCR 引物设计的总原则：在引物 5’端引入同源序列，使扩增产物与线性化载体之间具有完全一致的序列（16-25 bp）。

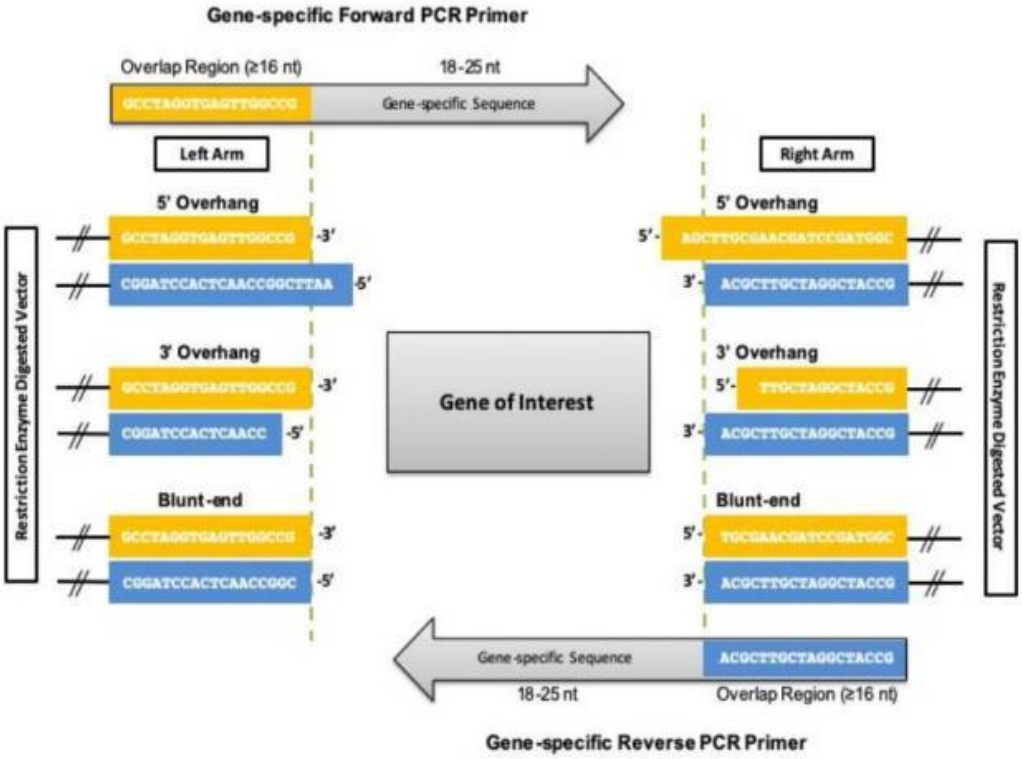
示例：

正向引物(5’→3’)：线性载体正向同源序列（16-25 nt）+插入片段正向特异引物序列（18-25 nt）

反向引物(5’→3’)：线性载体反向同源序列（16-25 nt）+插入片段反向特异引物序列（18-25 nt）

注:同源序列的碱基数 ≥16 bp，同源序列的 Tm 值>48° C（GC 含量 40%-60%；AT pair=2℃ and GC pair=4℃），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 Tm 值，载体末端同源序列不参与计算。

注 1：使用该方法克隆，用来线性化载体的酶切位点在连接时会丢失，如对酶切位点有严格要求，建议注意酶切位点的选择，必要时可在克隆引物的同源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。

注 2: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。

2） 插入片段 PCR 扩增

插入片段的扩增可使用任意种类的 DNA 聚合酶，无需考虑 PCR 产物末端是否带有 3’-A 尾（组装过程中将被去除）。建议使用高保真 DNA 聚合酶进行扩增，以减少突变的引入。

3） 纯化插入片段

如果扩增产物片段单一，建议使用 PCR 产物纯化试剂盒纯化片段；如果扩增产物含有杂带或引物二聚体，则建议使用胶回收纯化试剂盒切胶回收目的片段。

注：如插入片段使用环状质粒模板进行扩增，且该质粒与重组载体具有相同抗性，纯化前用 Dpn I 内切酶消化环状质粒模板，以降低假阳性克隆。

3. 无缝克隆反应

1）线性化载体与插入片段使用量计算

10 μL 反应体系中，载体与插入片段总加入量建议在 0.01-0.3 pmol。插入片段与线性化载体的最佳摩尔比为 2:1-3:1。如果插入片段小于 200 bp，则建议插入片段与线性化载体的摩尔比为 5:1。可根据片段以及载体的长度和质量来粗略计算插入片段及载体的 pmols 数，推荐以下计算公式：

pmols =（质量 ng）/（碱基对数 bp × 0.65 kDa）

例如：50 ng 长度 5000 bp 的双链 DNA 片段，约为 0.015 pmols。

常规大小的片段连接时，最优反应体系通常含有载体 50-100 ng，插入片段的摩尔数是载体的 2-3 倍。线性化载体和插入片段在反应体系中的用量，可简单按照如下公式计算：

$$\frac{\text{载体(ng)} \times \text{插入片段(kb)}}{\text{载体(kb)}} \times \text{摩尔比}(\textit{插入片段}:\textit{载体}) = \text{插入片段(ng)}$$

2）按照下表建立反应体系（可使用 PCR 管在冰上操作）

组分	样品	阳性对照	阴性对照 1	阴性对照 2
2×HiFi OneStep Cloning Mix	5 μL	5 μL	--	--
Linearized Control Vector（40 ng/μL）	--	1 μL	--	--
Linearized vector（10-80 ng）	x μL	--	x μL	--
Control Insert（20 ng/μL）	--	1 μL	--	--
Insert	y μL	--	--	y μL
ddH2O	补足至 10 μL	补足至 10 μL	补足至 10 μL	补足至 10 μL

注 1：2×HiFi OneStep Cloning Mix 含有 PEG 而比较粘稠，从冰箱取出温度较低时更加粘稠，推荐从冰箱去除后直接手握几分钟以提高温度，降低粘稠度（不影响质量），轻弹混匀并瞬时离心使液体集中在管底。

注 2:阴性对照 1 用于检测线性化载体中，有无环状质粒的残留。阴性对照 2 用于当插入片段是以环状质粒为模板时，检测有无扩增模板环状质粒残留。

3） 轻轻混匀，50℃反应 15 min（推荐在 PCR 仪中进行），反应结束后置于冰上，反应产物可直接转化感受态细胞或保存于-20℃。较长的片段的无缝连接反应，可适当延长反应时间至 30-60 min（最长不超过 60 min）。

4. 连接产物转化感受态细胞

以常规化学转化为例，具体方法请参考所使用感受态细胞的说明书；电转化需首先对连接产物进行脱盐处理。

1） 将感受态细胞置于冰上融解。

2） 取 10 μL 连接反应产物加入至 100 μL 感受态细胞中（连接反应液体积≤10%感受态细胞体积)，轻柔混匀，冰浴 10-30 min。

3） 42℃加热 45-60s 后，冰浴 2 min，该过程不要摇动离心管。

4）加入 800 μL SOC 或 LB 培养基，37℃振荡培养 40-60 min。

5）将菌液均匀涂布到适宜抗性的 LB 琼脂平板（与载体的抗生素抗性对应），37℃培养 12-16 h。

注：本产品提供的 Linearized Control Vector 阳性对照线性化载体为氨苄青霉素抗性。

5. 阳性克隆鉴定

1）常规鉴定：挑取单菌落并摇菌，提取质粒，应用电泳、PCR 或酶切等方法确定是否含有目的片段。

2）菌落/菌液 PCR：载体的通用型引物或基因特异性引物进行菌落/菌液 PCR 扩增。菌落/菌液 PCR 应尽可能设立阳性对照和阴性对照反应。

注：本产品提供 M13F/R 通用引物，可以用于检测阳性对照组的阳性率。

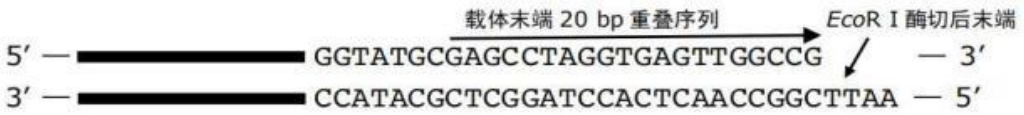
3） 酶切鉴定：挑取单菌落，摇菌抽提质粒。选用适宜的限制性内切酶进行酶切，琼脂糖凝胶电泳检测片段大小，鉴定重组子。

4） DNA 测序：选用载体通用型引物或基因特异性引物进行测序鉴定。

注意事项：

1． 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丢失，如对酶切位点有严格要求，建议注意酶切位点的选择，必要时可在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。举例说明如下：

A． 正向引物设计（EcoR I 酶切）：



如上图，载体用 EcoR I 酶切，形成 5’突出末端，根据引物设计原则，从 3’端开始计算 16-25bp（本例为 20 bp 末端重叠序列），加到目的片段特异引物序列 5’端即可。确保重叠区域的 Tm 值保持一致且＞60℃。正向引物具体如下：

5' — GAGCCTAGGTGAGTTGGCCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN —3'

注：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）。

如需保留 EcoR I 酶切位点，需要在载体末端 20 bp 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' — GAGCCTAGGTGAGTTGGCCGaattcNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN —3'

B． 反向引物设计（Hind III 酶切开）：

如上图，载体用 Hind III 酶切，形成 5’突出末端，根据引物设计原则，从 3’端开始计算 16 -25bp（本例为 20 bp 末端重叠序列），加到目的片段特异引物序列 5’端即可。确保重叠区域的 Tm 值保持一致且＞60℃。反向引物具体如下：

5' — CTGCCATCGGATCGTTCGCANNNNNNNNNNNNNNNNNNNN —3'

注：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）。

如需保留 Hind III 酶切位点，需要在载体末端 20 bp 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，完成克隆连接后，Hind III 酶切位点依然存在（保留酶切位点）。具体如下：

5' — CTGCCATCGGATCGTTCGCAagcttNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN —3'

2． 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。请勿存放于普通住宅区。

3． 为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。