

YALEPIC® 通用型无缝克隆同源重组酶预混液

YALEPIC® Universal Seamless Cloning and Assembly MasterMix

产品货号

YTD38003

产品保存及运输条件

- 20°C 储存, ≤ 0°C 运输。

产品概述

YALEPIC® Universal Seamless Cloning and Assembly MasterMix2 是基于同源重组原理开发的一步法单片段/多片段通用型等温无缝克隆试剂, 属于非连接酶依赖型体系, 载体自连背景极低, 可显著提高克隆的重组效率及对杂质的耐受程度, 制备的高纯度线性化载体和插入片段可不纯化直接用于重组克隆。本产品可快速、定向、准确的将含有载体末端重叠区域的插入片段 (单个片段, 或多至 5 个顺序拼接的片段) 定向重组至任何载体的任何位点, **50°C, 5 ~ 15 min 即可完成重组, 不受酶切位点限制**, 载体末端与插入片段末端以及相邻插入片段末端之间需要 15 ~ 25 bp 能够相互同源重组的完全一致的序列。本产品具有高保真、高效、便捷的 DNA 连接性能适用于文库构建等应用, 阳性克隆率高达 95%。

产品组成

组分	规格
2× YALEPIC® Universal Seamless Cloning and Assembly MasterMix2	100rxns

适用范围

适用于 1 ~ 5 个片段的 DNA 连接、高通量分子克隆、蛋白表达、多点突变等。

自备试剂及仪器

片段扩增用模板、引物; 线性化载体; 高保真聚合酶; 感受态细胞等

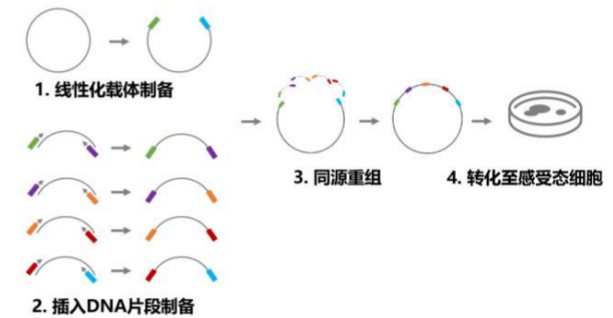
其他材料: ddH₂O、PCR 管、PCR 仪等。

技术原理

A. 单片段克隆重组原理图



B. 多片段克隆重组原理图



实验流程

● 线性化载体制备

选择合适的克隆位点, 对载体进行线性化。推荐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 20 bp 区域内 GC 含量均在 40% ~ 60% 之间时, 重组效率达到最大。

1. 酶切制备线性化载体。

- 1) 针对较大的载体且有合适的酶切位点时，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。
- 2) 建议酶切后取少量酶切产物进行电泳，以确保全部载体被切开。
- 3) 平末端和粘性末端均可。

注：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。如果假阳性克隆比例较高，推荐重新制备线性化载体。

2. 反向 PCR 扩增制备线性化载体

建议使用高保真 DNA 聚合酶进行载体的扩增，以降低扩增突变的引入。本试剂盒与常规 PCR 的反应体系兼容，如果 PCR 产物条带单一，则可直接用于后续的重组反应，若有杂带，则应将 PCR 产物进行电泳以及胶回收纯化后再用于无缝拼接，以提高产物纯度并去除一部分未线性化的环型载体，有利于提高重组效率。

- 1) 线型 DNA 序列作为模板时无需去除原本模板；
- 2) 环型质粒作为模板时则需要去除，可利用抽提模板带有甲基化修饰的特点，使用 Dpn I 酶切进行去除。

● 外源 DNA 插入片段制备

1. 设计用于扩增外源 DNA 片段的引物
插入片段扩增引物由两部分构成：同源序列+特异性引物，即在插入片的正/反向引物的 5' - 端引入同源序列，使扩增产物之间以及扩增产物与线性化克隆载体之间都具有能够相互同源重

组完全一致的序列(15 ~ 25 bp, 不包括酶切位点, GC 含量为 40 ~ 60%)。

引物设计方式:

Primer F 插入片段正向扩增引物:

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引物序列-3'

Primer R 插入片段反向扩增引物:

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

单片段连接引物设计图示:

线性化载体序列 (紫色和蓝色标志为上下游同源臂区域, 红色和绿色为酶切位点序列):

5'...NNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNN-----NNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNN...-3'
3'...NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNN NNNNNN-----NNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNN...-5'

插入片段序列 (加粗标志为特异性序列):

5'...NN...-3'
3'...NN...-5'

则插入片段扩增引物设计为:

5'...NN-3'
3'...NN-5'

多片段连接引物设计图示:

线性化载体序列 (紫色和蓝色标志为上下游同源臂区域, 红色和绿色为酶切位点序列):

5'...NNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNN-----NNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNN...-3'
3'...NNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNN NNNNNN-----NNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNN...-5'

插入片段序列 (加粗标志为特异性序列, 橙色及粉色为片段间重叠序列):

片段1 Primer F
5'...NN...-3'
3'...NN...-5'

片段2 Primer F
5'...NNNNNN...NN...-3'
3'...NNNNNN...NN...-5'

片段1 Primer R
5'...NN...-3'
3'...NN...-5'

片段3 Primer F
5'...NNNNNN...NN...-3'
3'...NNNNNN...NN...-5'

片段2 Primer R
5'...NNNNNN...NN...-3'
3'...NNNNNN...NN...-5'

则插入片段扩增引物设计为:

片段1:
Primer 1F: 5'...NN-3'
Primer 1R: 5'...NNNNNN...NNNNNN-3'

片段2:
Primer 2F: 5'...NNNNNN...NN...-3'
Primer 2R: 5'...NNNNNN...NNNNNN-3'

片段3:
Primer 3F: 5'...NNNNNN...NN...-3'
Primer 1R: 5'...NN...-3'

注:

- 1) 基因特异性正/反向扩增引物序列即常规插入片段正/反向扩增引物序列, Tm 值 60 ~ 65°C 为佳;
- 2) 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。
- 3) 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应参与计算。

2. PCR 扩增外源 DNA 片段

建议使用高保真 DNA 聚合酶进行外源 DNA 片段的扩增, 参考载体制备的流程, 若外源 DNA 的 PCR 扩增条带单一, 则可以不用纯化, 直接用于后续的拼接反应。但 PCR 扩增产物纯度较低时, 建议进行胶回收纯化, 有利于提高重组效率。

注: 如果用于制备外源 DNA 的模板为环型质粒, 且抗性和后续待拼接载体的抗性相同, 则残留的外源质粒模板会导致大量的转化背景, 影响目标克隆的挑选, 因而需要去除质粒模板; 可通过电泳法胶回收目的片段或者通过 Dpn I 酶切法去除带有甲基化修饰的环型质粒, 加热灭活或纯化去除。

重组反应

冰上配置反应体系, 50°C 反应 5 ~ 15 min, 反应结束后, 立即将反应产物置于冰上 5 min 以终止反应。反应产物可直接用于转化实验或冻存于 -20°C 备用。

组分	使用量
2× YALEPIC® Universal Seamless Cloning and Assembly MasterMix2	5 µl
线性化载体	40 ~ 200
外源 DNA 插入片段	10 ~ 200
ddH ₂ O	Up to 10 µl

注:

- 1) 10 µl 反应体系中, 载体与各个插入片段加入量建议均在 0.01~0.25 pmols, 载体与各个插入片段的最佳摩尔比为 1:1~1:2。

A: 若插入片段的长度小于 200 bp, 则插入片段与载体的摩尔比应调整为 5:1;

B: 当 1~2 个 DNA 片段插入载体时, DNA 总量推荐为 0.02~0.5 pmols; 当 4~6 个 DNA 片段插入载体 DNA 总量推荐为 0.2~1 pmols。

C: DNA 摩尔数与质量换算式: pmols = (重量) × 1000 / (base pairs × 650 daltons); 例如, 200 ng 的 6000 bp 载体为 0.05 pmols。

D: 载体片段过长、插入片段过长或片段数过多, 阳性克隆数及阳性克隆率均会降低。可适当延长反应时间, 或扩大反应体系。

- 2) 设置阴性对照, 不加 2× YALEPIC® Universal Seamless Cloning Assemble MasterMix2 负对照长出很多克隆, 则说明在载体制备或外源插入片段制备过程中存在载体线性化不完全、模板质粒未去除彻底等问题, 需重新制备或纯化。
- 3) 若不进行纯化, 可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 1 µl 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。
- 4) 建议使用 PCR 仪等温控较精准的仪器反应, 反应温度或反应时长相差太大都会影响克隆的效率。重组反应前后反应体系均需置于冰上。

● 重组产物转化

1. 冰上解冻克隆用感受态细胞。
2. 取上述反应液 10 µl 加入 100 µl 感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰上静置 30 min。
3. 42°C 水浴热激 90 sec 后, 立即置于冰上冷却 3 ~ 5 min。

4. 加入 900 μ l LB 等液体培养基（不添加抗生素），37°C 摇菌 50 min~1h。
 5. 将菌液 5,000 rpm 离心 5 min，弃去 800 μ l 上清，并用剩余培养液将菌体重悬，用无菌涂布棒将菌液涂布在含有正确抗性的平板上，于 37°C 培养箱中倒置培养 12~16 h。
 6. 平板上长出的克隆可以使用“菌落 PCR 的方法”进行快速鉴定。针对阳性克隆，可根据实验需求进行进一步的序列测定。
3. 反向 PCR 扩增制备线性化载体时，环型质粒作为模板，PCR 产物需用 Dpn I 处理，以减少环型质粒模板残留对克隆阳性率的影响。
 4. 反向 PCR 扩增制备线性化载体或外源片段时，若 PCR 产物单一，则可直接用于后续的重组反应，若 PCR 产物不单一，则应将 PCR 产物进行核酸电泳用胶回收进行纯化。
 5. 由于重组反应体系中含有盐离子，反应产物不可以直接电击转化。若需要电击转化，则需要对反应产物进行脱盐处理。由于用于反应的 DNA 很少，不推荐使用乙醇沉淀或者胶回收纯化，可使用适合微量 DNA 透析的滤膜进行脱盐处理。

注：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。

● 阳性克隆鉴定

1. 菌落/菌液 PCR 鉴定：用枪头挑取单菌落至 10 μ l ddH₂O 中混匀后取 1 μ l 为模板，或直接蘸取少量菌落至 25 μ l PCR 体系中扩增（建议至少使用一条通用引物，避免假阳性）；
 2. 以质粒为模板 PCR 鉴定：挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中，37°C, 220 rpm 过夜摇菌后抽提质粒作为模板，可使用载体通用引物或特异性引物扩增；
 3. 酶切鉴定（可选）：挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中，37°C, 220 rpm 过夜摇菌后抽提质粒，使用相应内切酶酶切质粒后电泳检测片段大小；
 4. 建议使用载体通用引物测序鉴定。
6. 直接使用酶切产物或 PCR 扩增产物进行重组反应时，建议添加的体积不超过总体积的 1/5。

注意事项

1. 酶切制备线性化载体时，大部分情况无需回收载体，但对于较大的外源模板，回收载体可提高克隆效率和阳性率。
2. 部分限制性内切酶产生粘性末端，其线性化的载体直接转化大肠杆菌可以在菌体内部获得修复，长出假阳性克隆，针对这种情况，建议更换酶、或双酶切、或加大验证的克隆数量。

本产品仅供研究使用，请勿用于临床诊断