

One-Step Seamless Gold Cloning Kits

最快 5 min 精准重组，阳性率高，彻底摆脱酶切位点限制

产品货号：M10701

产品规格：10 μ L $\times$ 50 T

储运条件：-20 $^{\circ}$ C避光保存；冰袋运输

产品简介：

One-Step Seamless Gold Cloning Kits是可快速将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点的无缝克隆试剂盒。使用任意方式将载体进行线性化，在插入片段正/反向扩增引物 5' 端引入线性化载体的末端序列，使得PCR产物 5' 和 3' 最末端分别带有和线性化载体两末端一致的序列(15~25 bp)。通过重组酶的作用使得具有重叠区域的片段和载体，在 50 $^{\circ}$ C 条件下 5~60 min 内即可完成片段与载体的定向重组。该试剂盒具备高效克隆阳性率超 98%，采用一管式Mix设计，操作简便，兼容 1~5 个片段的同源重组，总质粒长度 $\leq$ 15 kb可保持较高阳性率，且不限载体酶切位点与插入片段自带酶切位点。本产品应用广泛，可满足快速克隆、高通量克隆、DNA 定点突变及双链DNA与载体组装等多种实验需求。

基因克隆是基因功能验证、载体构建、生物制药研发等领域的基础核心步骤，高效精准的克隆技术直接决定实验进度与研究成果转化效率。无缝克隆技术作为简单、快速并且高效的DNA定向克隆技术，解决了酶切位点依赖、操作繁琐、效率低下等传统酶切连接克隆核心痛点，无需考虑酶切位点、快速重组、高阳性率等特性，大幅缩短实验周期，降低实验难度，为高通量载体构建、复杂基因簇组装、定点突变等复杂实验提供了可靠解决方案。

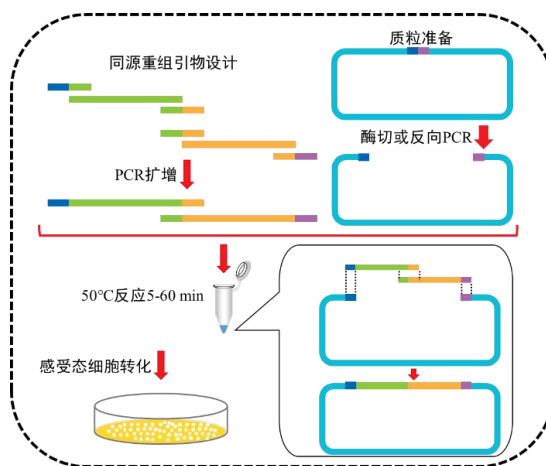


图 1. 流程示意图

注：效能等同NEB EBuilder[®] HiFi DNA Assembly Master Mix；

注：本文中EBuilder[®] 为NEB的商标及注册商标。

应用范围：快速克隆、载体构建、基因合成、DNA 定点突变、高通量克隆等；

产品特点：

- **高效高阳性率：**最快 5 min 内完成重组，阳性率超过 98%，大幅缩短实验周期并保障结果可靠性；
- **多片段复杂组装：**可一次完成 1~5 个片段的复杂重组，满足高效复杂构建需求；
- **载体与位点无限制：**彻底摆脱酶切位点依赖，无需对插入片段进行酶切处理，可在任意载体的任意位点实现定向克隆；
- **极简操作：**一管反应完成重组，步骤极简，省去酶切及酶切后切胶回收等多步骤；
- **产品稳定：**经 40 次反复冻融后，重组克隆活性无明显下降。



产品组分:

组分	10 μ L $\times$ 50 T
A. 2 $\times$ Super Fusion Cloning Mix	250 μ L
B. Control Vector, Linearized(Amp ^r , 40 ng/ μ L)	5 μ L
C. 500 bp Control Fragment(20 ng/ μ L)	5 μ L

注: 试剂盒使用次数为试剂盒组分 A 进行 10 μ L 反应体系的总数。

注意事项:

- 若所有PCR产物的总体积不超过无缝克隆反应总体系的20%可不经纯化直接使用, 组装3个及以上片段或长度大于5 kb 的片段时强烈建议柱纯化(效率可提升2~10倍), 纯化DNA可溶于无酶ddH₂O、TE缓冲液或其他中性稀释缓冲液。
- 单片段组装时插入片段与线性化载体的摩尔比应不低于2:1(推荐2:1~3:1), 组装3个及以上片段时建议各插入片段与线性化载体采用等摩尔比。
- 克隆效率与感受态细胞转化效率直接相关, 采用电转化时需将反应液稀释3倍后取1 μ L进行转化, 且重组产物转化体积不得超过所用感受态细胞体积的1/10。
- 含反向重复序列、串联重复序列的DNA片段可能被大肠杆菌选择性丢失, 部分对大肠杆菌有毒性的重组蛋白可能导致转化效率降低或菌落生长异常。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明:

一、实验前准备

1. 试剂准备:

- 将试剂盒中的组分 A(2 $\times$ Super Fusion Cloning Mix)、组分 B(Control Vector, Linearized)、组分 C(500 bp Control Fragment) 从储存条件(如-20 $^{\circ}$ C)取出, 放置于冰上或冰板上。

2. 仪器准备: PCR 仪。

3. 片段准备: 通过 PCR 反应制备的目标片段。

4. 对照组设置:

- 阴性对照(1): 检验线性化载体中是否有背景质粒残留。
- 阴性对照(2): 当插入片段扩增模板是与克隆载体抗性相同的环状质粒时, 推荐进行。
- 阳性对照(如有必要): 使用试剂盒带的片段。

二、操作步骤

1. 制备线性化克隆载体

- 选择合适的克隆区域对载体进行线性化, 此区域的选择应该尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域以提高线性化程度, 线性化载体可以通过酶切或者反向 PCR 扩增制备。

(1) 酶切制备

- 优先推荐双酶切, 此方法会使载体线性化更完全, 转化背景(假阳性克隆)低。经双酶切进行线性化的载体无需去磷酸化。
- 如果使用单酶切, 可通过适当延长酶切时间来减少环状质粒的残留。平末端或粘末端均可, 但是酶切完全是根本关键。注意, 单酶切的线性化载体需要去磷酸化。

注:

- (1) 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) 酶切后需进行胶回收纯化时, 可以通过核酸琼脂糖凝胶电泳进行检测产物。

(2) 反向PCR扩增制备

- 推荐使用预线性化载体质粒 DNA 为模板, 以减少环状质粒模板对克隆阳性率的影响。如果模板为环状质粒时, 扩增产物建议使用 Dpn I 消化后使用。扩增产物推荐使用高保真 PCR Mix 进行扩增, 克隆位点为分界点, 设计一对反向引物。扩增产物也可以进行胶回收纯化, 并通过核酸琼脂糖凝胶电泳进行检测产物。

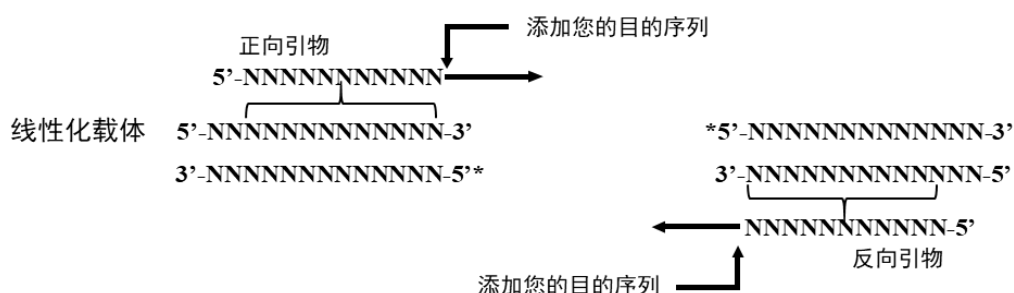


2. 设计插入 PCR 引物片段

- PCR 引物的 5' 端必须包含与其待重组的相邻片段或载体末端同源的 15~25 nt (推荐 18 nt, 不包括酶切位点) 序列, 使得扩增后的插入片段末端带有和线性化载体末端一致的同源序列。
- F 正向引物(5'-3'): 上游载体重叠区域+酶切位点(可选)+正向特异性引物扩增序列。
- R 反向引物(5'-3'): 下游载体重叠区域+酶切位点(可选)+反向特异性引物扩增序列。

注:

- (1) 若载体为粘性末端, 且 3' 端突出, 则引物设计必须包含部分; 若 5' 端突出, 则引物设计可以包含突出部分也可以不包含。
- (2) 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。
- (3) 计算扩增引物 Tm 值时, 只需计算特异引物的 Tm 值, 引入的额外序列无需计算。



(1) 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%。

(2) 无缝克隆反应

- 冰水浴中配制以下反应体系:

组分	反应体系	阴性对照(1)	阴性对照(2)	阳性对照 (如有必要)
2× Super Fusion Cloning Mix	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
线性化载体 ^a	50~200 ng	50~100 ng	-	1 μL
插入片段 ^b	10~200 ng	-	10~100 ng	500 bp, 1 μL
ddH ₂ O	Up to 10 μL			

(a) 最适载体用量(ng)=0.02×载体碱基对数, 即 0.03 pmol。

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

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;
- (5) 若某一组分浓度过高可适当稀释后使用, 每一个组分的用量最好不低于 1 μL;
- (6) 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。

- 将反应体系置于 50 °C, 反应 5~60 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) 插入 1~2 个片段时, 推荐反应时间为 5~15 min; 插入 3~5 个片段时, 推荐反应时间为 15~30 min;
- (3) 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;
- (4) 50 °C 反应完成后, 建议进行瞬时离心, 将反应液收集至管底。



- 将反应液离心管置于冰水浴中冷却，建议即时转化或储存于-20℃。

注：-20℃储存的重组产物，建议在1周内使用。

3. 克隆产物转化

- 在100 μL感受态细胞中加5~10 μL反应液（体积不超过所用感受态细胞体积的1/10），轻轻混匀，置于冰上25 min。然后42℃热激45~60 s，迅速转入冰浴中静置2~5 min。加入500~700 μL SOC或LB培养基（不含抗生素的无菌培养基），混匀后37℃振荡培养40~60 min(200 rpm)。根据实验需要，将菌液均匀涂布在含相应抗生素的平板上，将平板倒置于37℃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 $>10^8$ 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。

4. 阳性克隆检测

- (1) 菌落/菌液 PCR 鉴定：挑取单菌落至10 μL ddH₂O 中混匀，取1 μL 作模板，或直接蘸取菌落进行菌落 PCR 鉴定（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) 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℃，200 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（若有需要）：挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中，37℃，200 rpm 过夜摇菌后抽取质粒，使用相应内切酶切质粒后电泳检测片段大小。

注：

- (1) 必要时可进一步对阳性结果进行测序鉴定；
- (2) 测序引物序列：M13F: TGTAACACGACGGCCAGT; M13R: CAGGAAACAGCTATGAC。

三、结果判读

- 过夜培养后，重组产物转化平板形成数百个菌落。

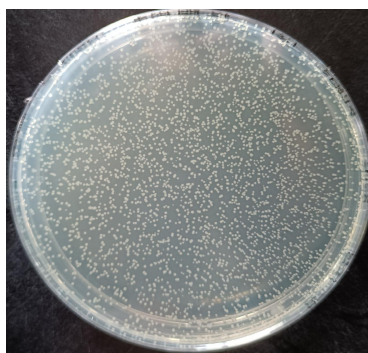


图1 重组产物转化平板

- 挑取重组反应转化平板上若干个克隆进行菌落 PCR 鉴定，经过琼脂糖凝胶电泳进行检测，得到符合预期条带大小的基因片段。菌落 PCR 鉴定为阳性的菌落，可再将剩余菌液接种至含有适当抗生素的液体 LB 培养基中培养过夜，提取质粒进行酶切鉴定，或直接进行一代测序。

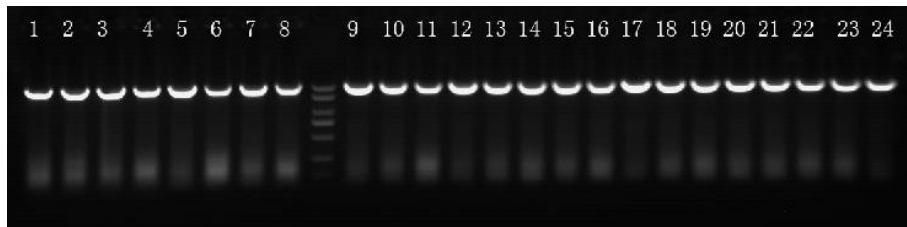


图2 菌落 PCR 琼脂糖凝胶电泳检测

常见疑问与解答：

- 问：转化效率低甚至是不长克隆都是由哪些原因造成的？

答：

- a. 感受态细胞因为保存时间或者质量不佳会引起转化效率低下，建议使用新制备的感受态细胞或者质量上佳的感受态细胞。



胞；

- b.线性化载体或插入片段比例不佳。请严格按照说明书推荐的方法计算各组分量，用琼脂糖凝胶电泳检测样品质量以及浓度；
- c.EDTA 等金属离子螯合剂会抑制无缝克隆实验；
- d.胶回收制备，最后洗脱时需要用水洗脱，不能用 TE Buffer 进行洗脱，用于重组反应的胶回收产物要溶解于 ddH₂O；
- e.插入片段纯度差；
- f.引物设计有误，设计时特别注意反向引物的序列顺序。

● 问：菌落PCR验证时为什么会出现大量空载体？

答：

- a.载体线性化不完全，没有完全切开；
- b.目的片段投入过低，导致连接失败。

● 问：多数克隆不含插入片段？

答：

- a.相同抗性质粒污染。PCR 扩增模板为环状质粒时，如扩增产物未纯化直接用于重组反应时推荐 Dpn I 消化，或者对扩增产物进行胶回收纯化；
- b.克隆载体及片段中含有质粒背景。克隆载体线性化不完全，酶切制备线性化载体时，要提高快速内切酶的使用量并延长反应时间，使用胶回收纯化酶切产物；制备插入片段时尽量用预线性化质粒作为扩增模板，扩增产物进行 Dpn I 消化以及进行凝胶回收纯化；
- c.PCR 产物混有非特异扩增产物：优化 PCR 体系，提高特异性；胶回收 PCR 产物；鉴定更多的克隆。

● 问：假阳性/测序无信号/空载体？

答：

- a.质粒载体残留导致的假阳性：设置阴性对照来排查，如果阴性对照长了很多，可能是模板投入量过多或者未进行 Dpn I 消化。若以质粒为模板 PCR 获得片段/载体：质粒投入量不宜过多(<1 ng)，否则可能导致 Dpn I 消化不完全而造成假阳性。建议 PCR 产物进行凝胶回收纯化，纯化产物溶解在 ddH₂O 中；
- b.挑斑方法不合适：重组产物 3' 端与 5' 端未连接，需要到感受态细胞中进行修复，斑点相对来说会小点；平板营养不均匀会导致斑点大小有差异；重组质粒相对原始质粒来说，有可能会影响细胞的生长。建议选取平板上某一块区域，同时挑选大斑和小斑，以增加挑到重组产物的概率；
- c.菌检引物不合适：建议使用载体通用引物或者引物一端在载体上，一端在目的片段上。如果用目的片段引物进行菌液 PCR，可能会出现菌检有结果而测序无结果。

● 问：插入片段出现碱基突变？

答：

- a.测序的样本数：如果只测了一个样本，不一定可信，需要多测几个样本；
- b.分析测序结果：检查突变处的测序信号是否有问题，若为双峰或者杂峰则不一定可信；
- c.检查突变位点：如果多个结果突变位点一致，可能是从模板上引入的或者模板序列与 NCBI 上不一致；
- d.插入片段在 PCR 获得时建议使用高保真聚合酶；
- e.若引物处发生碱基突变，考虑是引物合成问题，建议重新合成引物进行实验。

● 问：公司有两款无缝克隆产品，该如何选择？

答：我们的两款产品均为高效转化产品，可根据连接片段的不同进行选择：

产品货号	M10701	M10702	
产品名称	One-Step Seamless Gold Cloning Kits	One-Step Seamless Cloning Kits	
规格	10 μ L×50 T	10 μ L×20 T	10 μ L×50 T
稳定性	耐反复冻融	耐反复冻融、37 °C 可稳定保存一周以上	
插入片段适配性	适配 1-5 片段的重组，总质粒长度 $\leq$ 15 kb 阳性率较高	适配多个复杂片段重组，可实现最多 10 个 800 bp 片段的连接	

