



产品货号	G04D01S	G04D01M	G04D01L
产品规格	6T	20T	50T
2×无缝克隆预混液	30 μL	100 μL	250 μL
pUC19 Control Plasmid, Linearized (Ampr, 40 ng/μL)	5 μL	5 μL	5 μL
500 bp Control Fragment (20ng/μL)	5 μL	5 μL	5 μL

【产品介绍】

无缝克隆 (Non-Seam Cloning/In-Fusion Cloning) 技术, 是一种简单、快速、高效的 DNA 定向克隆技术。它区别于传统 PCR 产物克隆, 不依赖繁琐的酶切和连接步骤, 也不需要末端补平等操作, 唯一的差异在于使载体末端和引物末端具有 15~20 个同源碱基, 由此得到的 PCR 产物两端分别带上了 15~20 个与载体序列同源性的碱基, 依靠碱基间作用力互补配对成环, 无需酶连即可直接用于转化宿主菌, 进入宿主菌中的线性质粒 (环状) 依靠自身酶系将缺口修复。

本公司推出的 GPL 无缝克隆试剂盒为 2×重组 Mix, 可将插入片段克隆至任意线性载体的任意位点, 一次反应可完成单个至多个 DNA 片段的重组, 最快仅需 5min 即可完成单片段重组, 且阳性率高于 95%。此外, 试剂盒中添加的其它因子, 可有效提高克隆阳性率, 而且经优化升级的反应体系, 能够一定程度上耐受未纯化 PCR 产物中含有的杂质, 在克隆阳性率与兼容性方面表现卓著。

【需要但未提供的试剂/仪器】

- 引物、模板 (片段扩增用)、线性化载体
- 扩增试剂: 推荐使用 GPL 高保真 2×HI-FI PCR Mix (Cat: G02C02)
- 限制性内切酶
- 感受态细胞: 克隆菌株制备的化学感受态细胞
- 其它材料: ddH₂O、PCR 管、冰浴等
- PCR 仪

【实验流程】

1. 克隆载体线性化

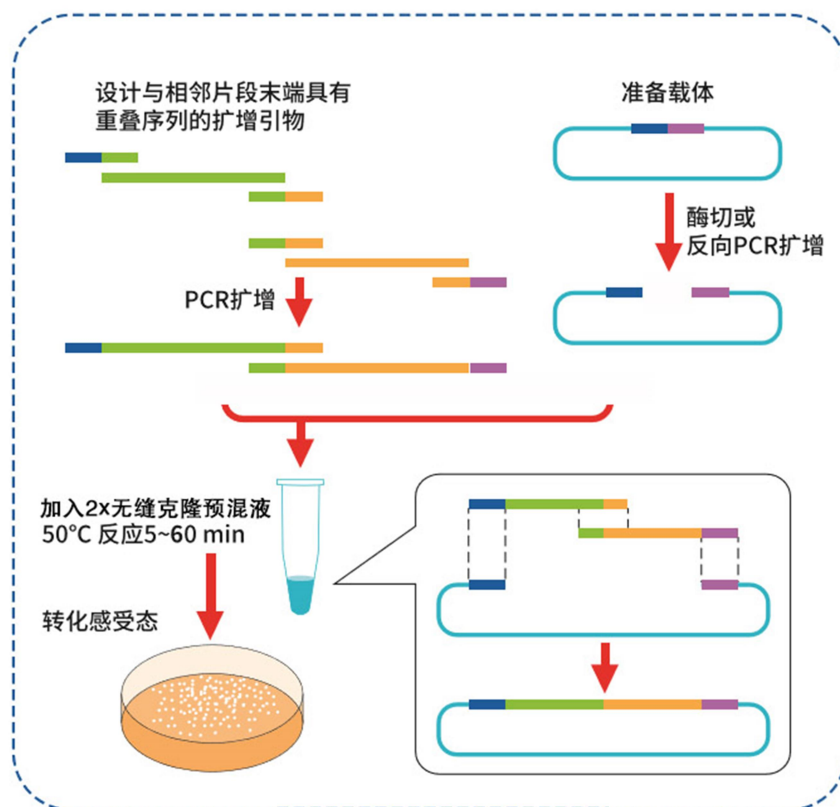
选择合适的克隆位点, 对载体进行线性化, 载体的线性化可以通过酶切或反向 PCR 扩增完成。

① 酶切制备

使用限制性内切酶进行载体线性化时, 推荐使用双酶切方法进行, 其次是单酶切。使用限制性内切酶使载体线性化完全, 可以适当延长酶切时间以减少环状质粒模板残留, 从而降低转化背景 (假阳性克隆)。

注 1: 经双酶切进行线性化的载体无需去磷酸化, 经单酶切则需要去磷酸化;

注 2: 酶切完成后, 应将限制性内切酶失活或将目的产物进行纯化后再用于重组反应。



实验流程

② 反向 PCR 扩增制备

载体末端引物设计:

反向 PCR 扩增制备线性化载体所使用的引物，详见《载体与插入片段、插入片段与片段连接处引物、载体反向扩增引物设计》部分。

为了减少扩增突变的引入，推荐使用 GPL 高保真 2×HI-FI PCR Mix (Cat: G02C02) 进行扩增，推荐使用预线性化的质粒作为模板，以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。

注：以环状质粒为模板时，PCR 产物需要使用 DpnI 等甲基化敏感型限制性内切酶对扩增产物进行处理，或对产物进行胶回收纯化。

2. 目的片段的获得

① 目的片段 PCR 引物设计

通常使用 PCR 扩增的方法来获得目的片段，PCR 引物的 5' 端必须包含与其相邻片段（插入片段或载体）末端同源的 15~25 nt（推荐 18 nt）序列，以保证扩增产物的 5' 端和 3' 端分别与相邻片段形成重叠序列。目的片段 PCR 引物包括：载体与插入片段连接处引物、插入片段与片段连接处引物。

载体与插入片段连接处引物:

所得线性载体的两端因线性方式（双酶切、单酶切、反向 PCR 扩增等）不同，分为三种末端结构的任意组合，详见《不同载体末端引物设计说明》部分，插入片段的特异性引物的设计仍然遵循通常引物设计的原则。

插入片段正向扩增引物:

5' —上游载体末端正向同源序列+酶切位点（可选）+基因特异性正向扩增序列— 3'

插入片段反向扩增引物:

3' —基因特异性反向扩增序列+酶切位点（可选）+下游载体末端反向同源序列— 5'

GPL 无缝克隆试剂盒 (Non-Seam Cloning Mix)



金普来
Gene-Protein Link

制作最终序列图谱



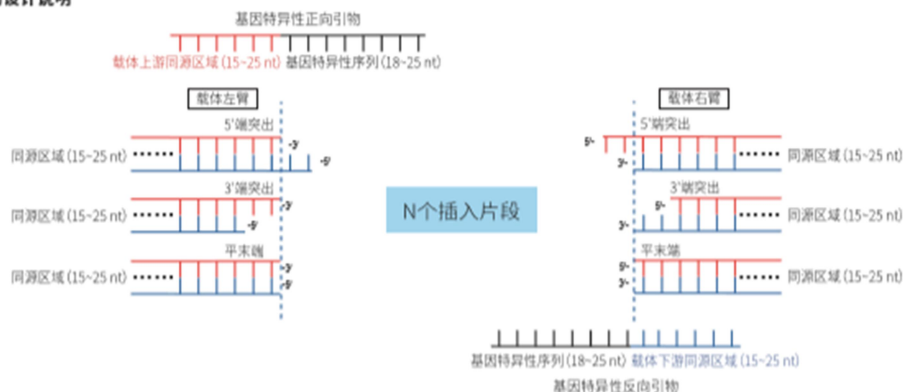
标记载体与插入片段、插入片段与片段连接处



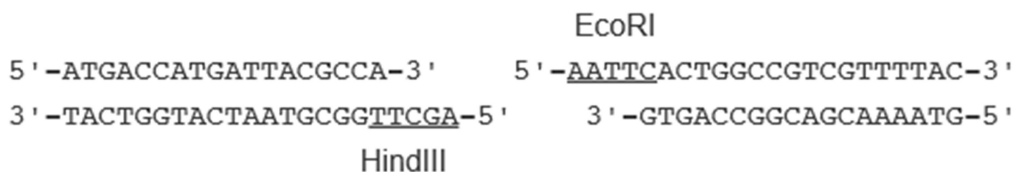
载体与插入片段、插入片段与片段连接处引物、载体反向扩增引物设计



不同载体末端引物设计说明



- 注 1: 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;
- 注 2: 最终的 PCR 引物长度如果超过 40 nt, 推荐在引物合成时选用 PAGE 纯化;
- 注 3: 本试剂盒所提供的 pUC19 Control Plasmid, Linearized (Ampr) 连接端的序列如下:



② 插入片段的 PCR 扩增

推荐使用 GPL 高保真 2×HI-FI PCR Mix (Cat: G02C02) 进行扩增插入片段的扩增, 以减少突变的引入。

注: PCR 产物建议纯化后再进行重组反应; 若 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定为特异性扩增产物, 可以直接使用, 但加样体积不应超过 2 μL (总反应体积的 20%)。

3. 重组反应

① 线性化载体和插入片段的浓度测定

进行载体和插入片段的浓度测定时, 若线性化载体与插入片段已经过纯化, 且经电泳检测条带单一或无 Smear 残留时, 可使用超微量核酸蛋白检测仪等基于分光光度法的仪器进行浓度测定, 当 A260/A280 在 1.8~2.0 之间时浓度值可信; 若线性化载体与插入片段未经过纯化, 也可以使用琼脂糖电泳测定样品浓度。



② 于冰水浴中配制以下反应体系:

试剂	使用量	阴性对照	阳性对照 (如有必要)
无缝克隆预混液	5 μ L	5 μ L	5 μ L
线性化载体 ^a	50~200ng	50~100ng	pUC19 Control Plasmid, Linearized (Ampr, 40 ng/ μ L)
插入片段 ^b	10~200ng		500 bp Control Fragment (20 ng/ μ L)
ddH ₂ O	To 10 μ L	To 10 μ L	To 10 μ L

a. 最适载体用量 (ng) = $0.02 \times$ 载体碱基对数, 即 0.03pmol (单片段、多片段适用);

b. 最适片段用量 (ng) = $0.04 \times$ 片段碱基对数 (单片段);

最适片段用量 (ng) = $0.02 \times$ 片段碱基对数 (多片段)。

注 1: 单片段重组反应, 若单个插入片段的长度大于载体, 则应将载体与插入片段的计算公式互换;

注 2: 单片段重组反应, 若单个插入片段的长度小于 200 bp, 则插入片段应使用 5 倍的用量;

注 3: 多片段重组反应, 各个插入片段的用量应不少于 10 ng, 使用上述公式计算最适使用量低于此值时, 直接使用 10 ng;

注 4: 若按上述公式计算出的线性化载体用量低于 50 ng 或高于 200 ng, 建议按照 50 ng 或 200 ng 用量使用;

注 5: 线性化载体过长, 插入片段过长或片段数过多, 克隆阳性率均会降低。

重组反应体系配制完成后, 用移液器轻轻吸打混匀各组分, 避免产生气泡, 切勿涡旋。

③ 将反应体系置于 50 $^{\circ}$ C, 反应 5~60 min。

注 1: 推荐使用 PCR 仪等温控精准的仪器进行反应, 反应时间不足或太长, 克隆效率均会降低;

注 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;

注 3: 当载体骨架在 10 kb 以上或插入片段总长在 4 kb 以上时, 推荐延长反应时间至 30~60 min;

注 4: 建议在 50 $^{\circ}$ C 反应完成后进行瞬时离心, 将反应液收集至管底。

④ 将反应液离心管置于冰上冷却, 之后进行转化或者储存于 -20 $^{\circ}$ C。

注: 在 -20 $^{\circ}$ C 储存的重组产物, 建议 1 周内使用完毕。

4. 重组产物转化

① 将克隆用的化学感受态细胞置于冰上解冻;

② 取 5~10 μ L 重组产物反应液, 加入到 100 μ L 感受态细胞中, 缓慢吸打混匀, 冰上放置 30 min;

③ 42 $^{\circ}$ C 热激 45~60sec, 冰浴 5min;

④ 加 500 μ L SOC 或 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 40~60min (200rpm);

⑤ 将菌液均匀涂布在含有对应抗生素的平板上, 倒置于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

注 1: 推荐使用转化效率 > 108CFU/ μ g 的感受态细胞;

注 2: 菌落数取决于 PCR 产物与线性化载体的数量和纯度。

5. 阳性克隆鉴定

① 菌落 PCR 法

挑取单菌落至 10 μ L ddH₂O 中混匀, 95 $^{\circ}$ C 裂解 10 min 后, 取 1 μ L 裂解液作为模板, 使用合适的正、反向引物进行菌落 PCR 鉴定。

GPL 无缝克隆试剂盒 (Non-Seam Cloning Mix)



注：菌落 PCR 时建议至少使用一条通用引物，以避免假阳性结果。

② 酶切法

挑取单菌落接种至合适抗性的液体培养基中过夜培养后，提取质粒进行酶切鉴定。

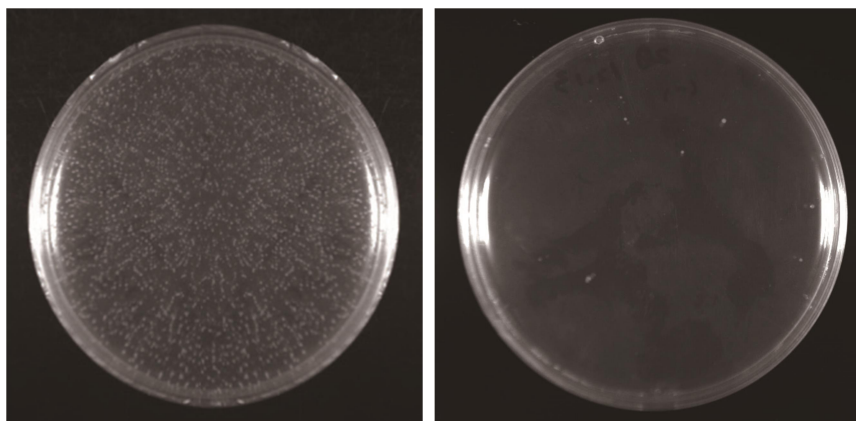
③ 测序鉴定

使用载体的通用引物测序，进行序列分析。

【注意事项】

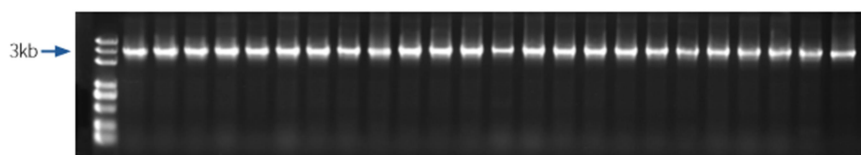
- 单次完成多个插入片段或者重组质粒的长度较长时，推荐使用高效率感受态细胞进行重组产物转化；
- 若使用未纯化的 PCR 扩增产物进行重组反应时，加样体积不应超过 2 μ L（总反应体积的 20%）；
- 以质粒为模板进行插入片段 PCR 扩增时，若后续使用 DpnI 消化处理，应在反应完成后失活 DpnI，以免降解重组载体。

【结果举例】



重组产物转化平板

阴性对照转化平板



菌落 PCR 鉴定阳性克隆



【常见问题】

问题描述	可能原因	解决办法
转化效率低	感受态效率低下	使用新制备或妥善保存的感受态细胞。
	DNA 片段比例不佳	按照说明书推荐的最适用量和比例配制反应体系。载体和插入片段的浓度测定：若线性化载体与插入片段已经过纯化，且经电泳检测条带单一或无 Smear 残留时，可使用超微量核酸蛋白检测仪等基于分光光度法的仪器进行浓度测定，当 A260/A280 在 1.8~2.0 之间时浓度值可信；若线性化载体与插入片段未经过纯化，也可使用琼脂糖电泳测定样品浓度。
	DNA 片段纯度不够	对载体和插入片段进行胶回收纯化。由于 EDTA 等金属离子螯合剂会抑制无缝克隆反应，因此纯化产物应溶解于 ddH ₂ O 中，切勿使用 Tris-EDTA 等缓冲液。
	反应产物过量	在转化体系中，无缝克隆反应产物体积不应超过感受态细胞体积的 10%。
大量克隆不含插入片段	载体线性化不完全	载体线性化反应时，提高限制性内切酶的使用量，延长反应时间，或使用胶回收纯化酶切产物。
	相同抗性质粒污染	以质粒为模板进行插入片段 PCR 扩增时，使用预线性化质粒作为扩增模板，使用 DpnI 等甲基化敏感型内切酶对扩增产物进行处理，或对产物进行胶回收纯化。
	平板抗性不足	确保使用正确的抗生素，并使用新鲜制备的抗生素平板。
大量克隆含有不正确插入片段	非特异性 PCR 扩增产物	优化 PCR 体系，提高特异性，或胶回收纯化 PCR 产物重叠序列的扩增引物。

【相关产品】

货号	产品名称	规格
G02C01	2×PCR Mix (+Dye)	1mL/5mL/50mL
G02C02	2×HI-FI PCR Mix	1mL/5mL
G02C03	SYBR Green qPCR Mix (None Rox)	1mL/5mL
G02C04	SYBR Green qPCR Mix (Low Rox)	1mL/5mL
G02C05	SYBR Green qPCR Mix (High Rox)	1mL/5mL
G03R01	第一代逆转录预混液 RT-Mix	10T/100T
G06Q01	GPL 安全核酸染料	500μL

Version: 20181106 (第一版)