

YALEPIC® 通用型无缝克隆重组试剂盒

YALEPIC® Universal Seamless Cloning Assemble Kit

产品货号

YTD38001

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 Assemble Kit 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 11 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	500 µl
Control (Linearized plasmid + Insert fragment, Amp ^r)	40 µl

注: 阳性对照 Control 中包含了 4.6 kb 的线性化载体和 1 kb 的插入片段, Amp 抗性。使用时直接取 5 µl Control 加入 5 µl Cloning Assemble MasterMix2, 即组成 10 µl 重组反应体系。

适用范围

适用于 1 ~ 11 个片段的 DNA 连接、高通量分子克隆、蛋白表达、多点突变等。

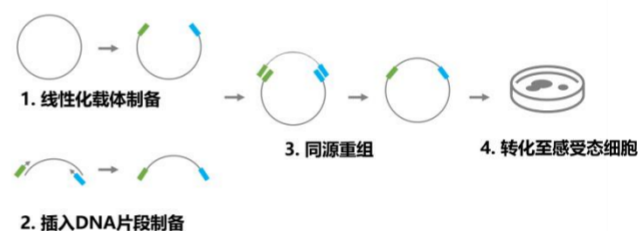
自备试剂及仪器

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

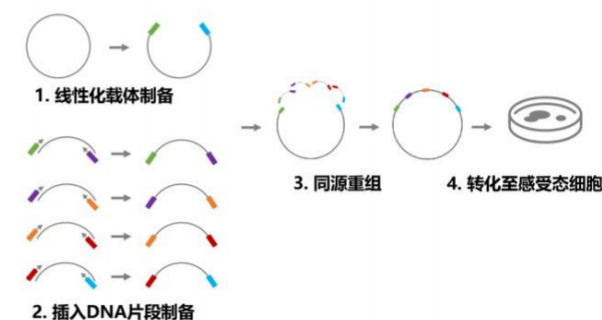
其他材料: ddH₂O、PCR 管、PCR 仪等。

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。尽量选

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， T_m 值 $60 \sim 65^\circ\text{C}$ 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 $40\% \sim 60\%$ 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 T_m 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 $5 \sim 15 \text{ min}$ ，推荐反应 15 min ，若链接片段超过 5 个，建议延长反应时间至 30 min ，反应结束后，立即将反应产物置于冰上 $3 \sim 5 \text{ min}$ 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	10 ~ 100 ng
外源 DNA 插入片段	10 ~ 100 ng
ddH ₂ O	Up to 10 μl

注：

- 1) 10 μl 反应体系中，载体加入量建议在 0.03 pmols 左右，载体与插入片段的最佳摩尔比为 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: 多个片段连接时，建议片段间的摩尔比为 1:1。
 C: DNA 摩尔数与质量换算式: $\text{pmols} = (\text{重量}) \times 1000 / (\text{base pairs} \times 650 \text{ daltons})$; 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。
 E: 单片段拼接时，插入片段的使用量应大于 20 ng，若插入片段长度大于载体，最适载体与插入片段的使用量计算方式应互换，即将插入片段当做载体，载体当做插入片段进行计算。
- 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) 单片段拼接时若扩增产物无非特异条带，可不纯化直接使用，加入反应的未纯化产物体积应小于总体系的 1/5，即 2 μl ，但重组效率可能降低，推荐纯化后进行重组。
- 4) 若不进行纯化，也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。
- 5) 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 μ l 加入 100 μ l 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。

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。

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，建议更换酶、或双酶切、或加大验证的克隆数量。
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。
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。

本产品仅供研究使用，请勿用于临床诊断