

产品说明书

产品名称: Minerva Super Fusion Cloning Kit (无缝克隆试剂盒)

产品货号: M2026S, M2026L

产品规格: 10 μ L $\times$ 20T, 10 μ L $\times$ 50T

产品内容:

组分	M2026S (10 μ L $\times$ 20T)	M2026L (10 μ L $\times$ 50T)
Super Fusion Cloning Mix (2 $\times$)	100 μ L	250 μ L
Control Plasmid, linearized (Amp ^r , 40 ng/ μ L)	5 μ L	5 μ L
500 bp Control Fragment (20 ng/ μ L)	5 μ L	5 μ L

注: 微量体积试剂请在正式实验开始前进行瞬时离心操作。

储存条件

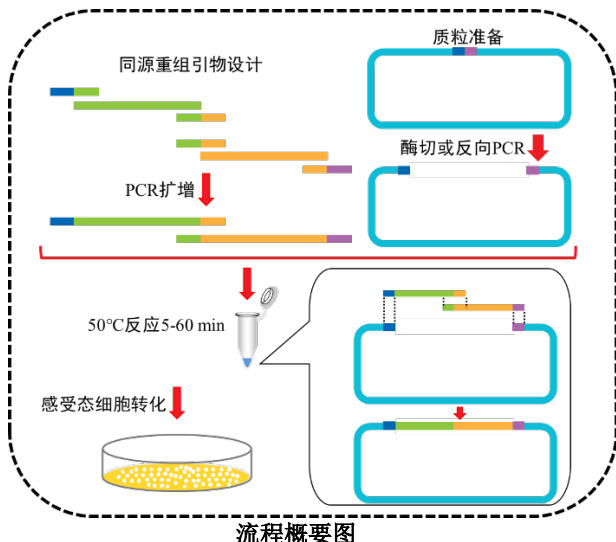
-20 $^{\circ}$ C保存, 有效期见外包装。

产品介绍

无缝克隆是一种简单、快速并且高效的 DNA 定向克隆技术, 可将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。Minerva Super Fusion Cloning Mix 通过识别 DNA 片段和线性化载体末端的 15-25 bp 同源序列, 50 $^{\circ}$ C 反应 5-60 min 即可将 DNA 片段和线性化载体高效精确地融合在一起, 完成定向克隆, 且克隆阳性率可达 95% 以上。

产品特点

1. 简单、快速、高效, 可将插入片段克隆至任意线性载体的任意位点;
2. 不依赖于连接酶, 无载体自连, 阳性率可达 95% 以上;
3. 无需考虑插入片段自身携带的酶切位点;
4. 一次反应可完成单至多个片段重组。



使用方法

一. 制备线性化克隆载体

选择合适的克隆位点, 对载体进行线性化, 线性化载体可以通过酶切或者反向 PCR 扩增完成。

(1) 酶切制备

双酶切: 线性化完全, 转化背景 (假阳性克隆) 低;

单酶切: 线性化程度差, 可通过适当延长酶切时间来减少环状质粒的残留。

注: (1) 双酶切无需去磷酸化, 单酶切需要去磷酸化;

(2) 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) 反向 PCR 扩增制备

载体质粒 DNA 为模板, 克隆位点为分界点, 设计一对反向引物, 推荐使用高保真 PCR Mix 进行扩增。

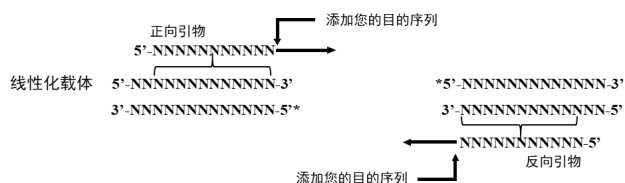
二. 设计插入 PCR 引物片段

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。假如载体为粘性末端, 且 3' 端突出, 则引物设计必须包含突出部分; 若 5' 端突出, 则引物设计可以包含突出部分, 也可以不包含。

插入片段扩增引物:

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序列—3'

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



注：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。

三. 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%。

四. 无缝克隆反应

1. 冰水浴中配制以下反应体系：

组分	反应体系	阴性对照	阳性对照 (如有必要)
Super Fusion Cloning Mix (2×)	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	-	500 bp, 1 μL
ddH ₂ O	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。

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。

2. 将反应体系置于 50℃，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℃ 反应完成后，建议进行瞬时离心，将反应液收集至管底。

3. 将反应液离心管置于冰水浴中冷却，直接进行转化或储存于 -20℃。

注：-20℃ 储存的重组产物，建议在 1 周内使用。

五. 克隆产物转化

在 100 μL 感受态细胞中加入 5-10 μL 反应液，轻柔吹吸混匀，置于冰上 30 min。42℃ 热激 45~60 s，冰浴 5 min。加入 500 μL SOC 或 LB 培养基，37℃ 振荡培养 40-60 min (200 rpm)。将菌液均匀涂布在含相应抗生素的平板上，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 > 10⁸ 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。

六. 阳性克隆检测

菌落 PCR 鉴定：挑取单菌落置于 10 μL ddH₂O 中混匀，95℃ 裂解 10 min，取 1 μL 作模板，进行菌落 PCR 鉴定。

注：(1) 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) 必要时可进一步对阳性结果进行测序鉴定。

(3) 测序引物序列：M13F: TGTAACACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAACAGCTATGAC

常见问题

问题描述	可能原因	解决方法
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 片段比率不佳	按照说明书推荐的最适用量和比率配制反应体系。常用的吸光测量法易受 DNA 纯度、缓冲液 pH 值等因素影响，测定偏差较大，因此推荐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	酶切制备线性化载体时，提高限制性内切酶使用量，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 等甲基化敏感性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。

