

Product Manual

产品说明书

产品货号

PR01032

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 °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。流程示意图见图 1。

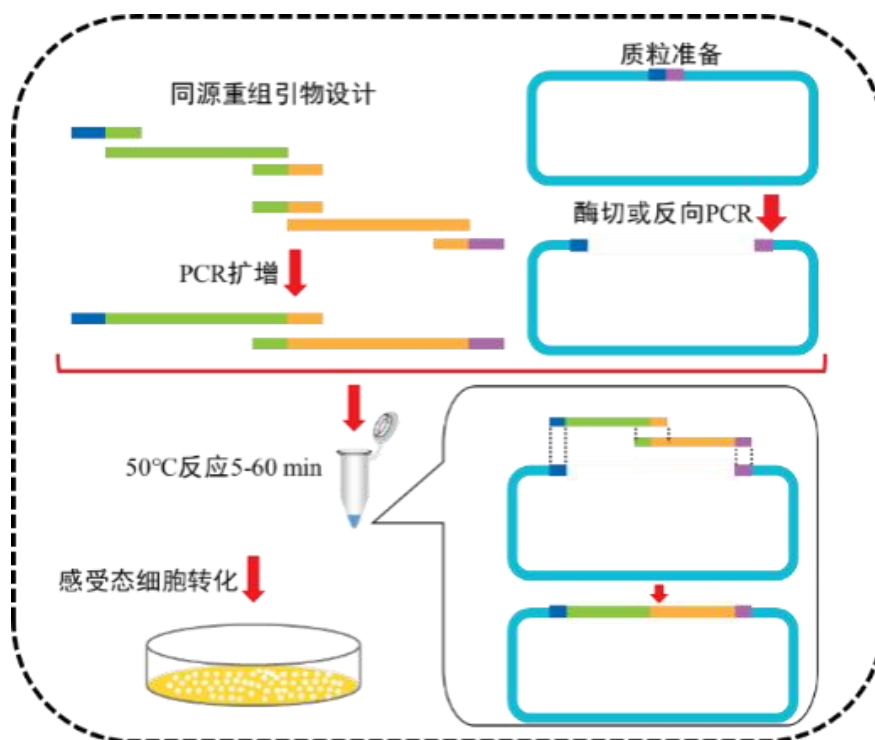


图 1 流程示意图

应用范围

载体构建、基因合成

储运条件

-20 °C 避光保存，有效期见外包装；冰袋运输。

产品特点

重组率高：不依赖于连接酶，无载体自连，阳性率可达 95% 以上；

高效快捷：一次反应可完成单至多个片段重组。

注意事项

1. 本产品仅限于科研，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

自备材料

- 1.耗材
- 0.2 mL 离心管
- 2.试剂
- (1) 线性化载体 (2) 目的片段

操作步骤

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。

- (一) .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。

(二) 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。

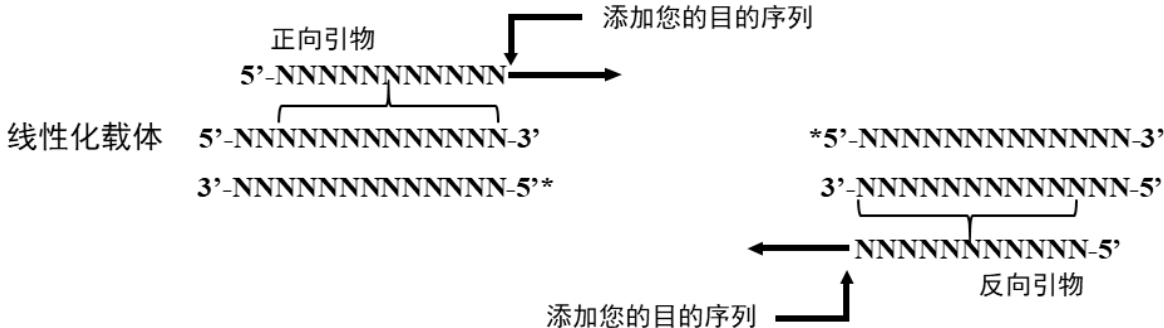
二、设计插入 PCR 引物片段

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。

(一) 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，可直接可用于无缝克隆反应，但加样的体积不宜超过反应总体积的 20%。

(二) 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
ddH2O	To 10 μL		

(1) 最适载体用量 (ng) = $0.02 \times$ 载体碱基对数, 即 0.03 pmol。

(2) 插入单片段时, 最适片段用量 (ng) = $0.04 \times$ 片段碱基对数; 插入多片段时, 每片段最适用量 (ng) = $0.02 \times$ 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) 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 °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。

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 °C。

注: -20 °C 储存的重组产物, 建议在 1 周内使用。

三、克隆产物转化

在 100 μ L 感受态细胞中加入 5~10 μ L 反应液, 轻柔吹吸混匀, 置于冰上 30 min。42 °C 热激 45~60 s, 冰浴 5 min。加入 500 μ L SOC 或 LB 培养基, 37 °C 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 °C 培养箱培养过夜。

注: (一) 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/ μ g 的感受态细胞。

(二) PCR 产物与线性化载体的数量和纯度决定了菌落数。

(三) 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。

四、阳性克隆检测

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

注: (一) 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。

(二) 必要时可进一步对阳性结果进行测序鉴定。

(三) 测序引物序列: M13F: TGTAACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAACAGCTATGAC