

版本号：20240327

Visclone Universal One Step Cloning Kit

通用一步法克隆试剂盒

产品编号：CR101-50T

产品内容：

组分名称	规格-50T
2×Visclone Universal Cloning mix	250 μL
pUC19 Control Plasmid,Linearized (Amp ^r ,40 ng/μl)	5 μL
Control Fragment (500 bp,20 ng/μl)	5 μL

运输及储存条件：蓝冰运输；-20℃保存 12 个月，避免反复冻融。

产品介绍:

Visclone Universal One Step Cloning Kit 是基于同源重组原理开发的一款简单、快速、高效的无缝克隆试剂盒,可快速将含有载体末端重叠区域的插入片段定向克隆至线性化载体。将载体通过酶切进行线性化处理,在插入片段正/反向 PCR 扩增引物的 5'端引入线性化载体上的 15~25 nt 末端序列,通过重组酶的作用使得具有重叠区域的片段和载体最快在 50°C, 5 min 内重组,完成定向无缝克隆。

本产品为通用型 Mix,可以兼容 1~5 个 DNA 片段的重组反应,2×Visclone Universal Cloning mix 中添加的辅助因子和优化的反应体系使产品具有更高的阳性率和兼容性。试剂盒提供的 pUC19 Control Plasmid 和 Control Fragment 可以作为阳性对照用于排除实验其它操作因素的影响。

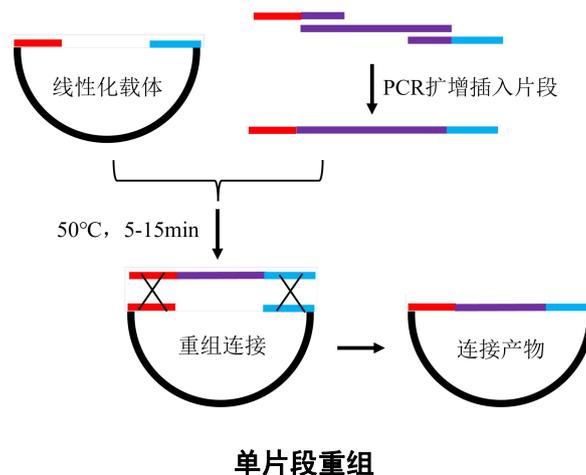
产品特点:

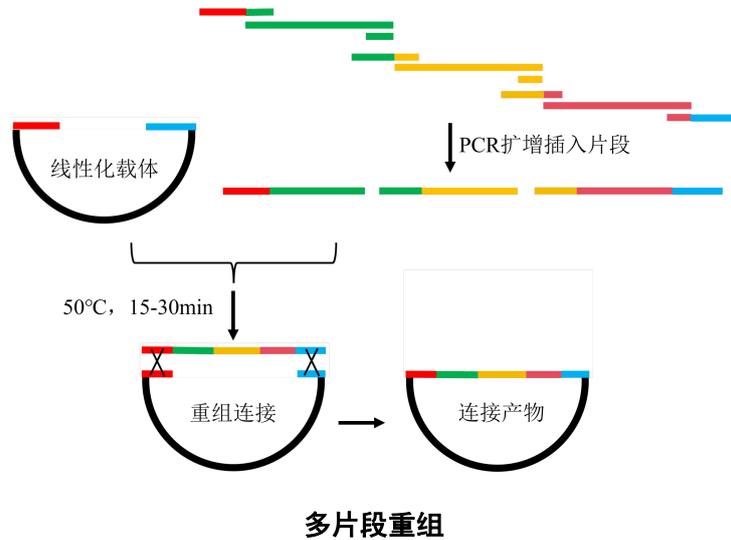
1. 快速:单片段重组最低只需 5 min,多片段重组最低只需 15 min。
2. 兼容性强:适用于 1-5 个片段的快速无缝克隆、定点突变和高通量克隆等实验。
3. 无缝:插入位点无需引入不需要的碱基序列,真正实现无缝克隆。

注意事项:

1. 重组产物冰上冷却后,可直接转化化学感受态细胞,推荐使用商业化感受态进行转化,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。
2. 自备材料:片段扩增所需模板、引物;线性化载体;高保真聚合酶;感受态细胞等。

原理示意图:





操作步骤：（在开始操作前请先阅读注意事项）

（一）线性化载体的制备

酶切线性化。选择酶切位点时，单酶切或双酶切，产生平末端或者粘末端均可。推荐使用双酶切使载体线性化更完全，以降低转化背景。使用单酶切线性化载体时，可以适当延长酶切时间以减少环状质粒残留。酶切后建议使用胶回收纯化。

注意：酶切载体时务必保证酶切完全。

（二）插入 DNA 片段的制备

1. 引物设计原则

一步法无缝克隆引物设计总原则：通过在引物 5'端引入线性化克隆载体末端同源序列，使得插入片段扩增产物 5'和 3'最末端分别带有和线性化克隆载体两末端对应的完全一致的序列(16 bp ~ 25 bp)。

2. 插入片段引物设计（见示例）

插入片段扩增引物由两部分构成：重叠序列+插入片段特异性引物。

克隆正向引物（5'-3'）：线性载体正向 16 bp ~ 25 bp 重叠区序列+酶切位点（可选）+插入片段正向特异性引物序列（18 ~ 25 nt）

克隆反向引物（5'-3'）：线性载体反向 16 bp ~ 25 bp 重叠区序列+酶切位点（可选）+插入片段反向特异性引物序列（18 ~ 25 nt）

注意：

- 重叠区域的碱基数至少 16 bp，并且多段重叠区域之间的 Tm 值需保持一致且 > 60°C (AT pair = 2°C and GC pair = 4°C)，否则可延长碱基数目直到符合要求，插入片段特异性引物设计的原则遵循一般引物设计的原则即可；
- 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；
- 计算扩增引物退火温度时，只需计算插入片段特异性引物的 Tm 值，引入的额外序列无需计算。

3. 插入片段扩增

使用高保真 DNA 聚合酶或者 PCR Mix 进行插入片段扩增。

4. 纯化插入片段

扩增产物跑胶后观察条带。如果目的条带单一，建议用 PCR 产物纯化方式纯化片段。如果有非特异扩增，则建议用胶回收方式回收片段。

注意：

- 使用该方法克隆，用来线性化载体的酶切位点在拼接的时候会缺失，如果对酶切位点有严格要求的，建议注意酶切位点的选择，必要时可在正反向克隆引物的重叠区序列和特异基因序列之间增加缺失掉的碱基来恢复原有酶切位点。
- 如果重组质粒用于蛋白表达，则在引物设计时注意读码框，蛋白表达及纯化所需序列（如启动子，RBS 序列，起始密码子，终止密码子，蛋白标签等）不被破坏。

可选步骤：如果片段来源于质粒模板，且该质粒与重组载体具有相同抗性，纯化前用 *Dpn* I 内切酶消化质粒模板，可降低背景，提高阳性率。

示例一：单个插入片段扩增引物设计（以 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切线性化载体为例）

线性化载体序列（红色和绿色分别表示上下游同源臂区域、蓝色表示酶切位点）

5'-...cgcggtg**cgggcgcctagaactag**GGATCC-----AAGCTTatcgataccgtcgacctcgagggg...- 3'
3'-...ggccaccgccggcgagatcttgatca**CCTAGG**-----TTCGAA**tagctatggcagctggagct**cccc...- 5'

插入片段序列，加粗部分为特异引物序列

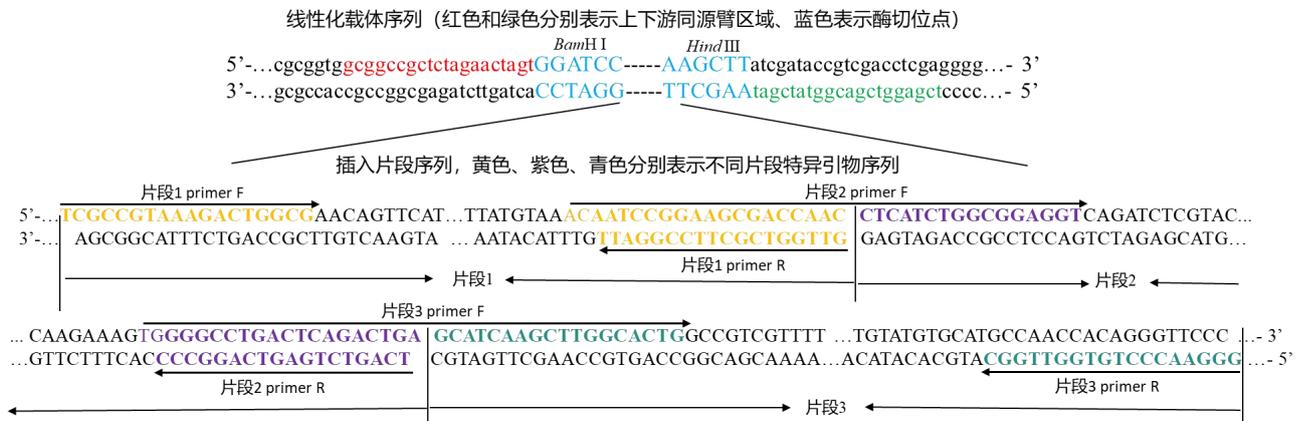
5'-... **TCGCCGTA**AAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTC-----ATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAAC...- 3'
3'-... AGCGGCATTTCTGACCGCTTGTCAAGTATGTCTCAG -----TACAGCCAATACATTGTTAGGCCTTCGCTGGTTG...- 5'

插入片段扩增引物设计为：

上游引物F (5'-3') : **cgggcgcctagaactag**+GGATCC(可选)+**TCGCCGTA**AAGACTGGCG

下游引物R (5'-3') : **tcgaggtcgacggtatcgat**+AAGCTT (可选)+**GTTGGTCGCTTCCGGATTGT**

示例二：多个插入片段扩增引物设计（以 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切线性化载体为例）



则插入片段扩增引物设计为：

片段1
上游引物F (5'-3') : **cgggcctctagaactag**+**GGATCC**(可选)+**TCGCCGTAAAGACTGGCG**
下游引物R (5'-3') : **GTTGGTTCGCTTCCGGATT**
片段2
上游引物F (5'-3') : **ACAATCCGGAAGCGACCAAC**+**CTCATCTGGCGGAGGT**
下游引物R (5'-3') : **TCAGTCTGAGTCAGGCC**
片段3
上游引物F (5'-3') : **TGGGGCCTGACTCAGACTGA**+**GCATCAAGCTTGGCACTG**
下游引物R (5'-3') : **tcgagctgacggatcatg**+**AAGCTT** (可选)+**GGGAACCTGTGGTTGGC**

注意：

插入多个片段时引物设计：第一片段的上游引物和第三片段的下游引物，分别按照单片段插入的方式引入载体两端的同源序列即可；片段间同源序列引物设计有三种方式：（在多片段引物设计时，选择任意一种方式或者两种方式混用均可，保证片段与片段之间有 16~25 bp 的重叠区）

- a. 以前一片段 3'端 15~25 nt 作为同源序列添加至后一片段 5'端（如示例二图所示）；
- b. 以后一片段 5'端 15~25 nt 作为同源序列添加至前一片段 3'端；
- c. 两片段各取一部分作为同源序列（总计 16~25 nt），分别添加至另一片段末端。

(三) 重组反应

1. 反应体系配制（推荐 10 μL 反应体系）

按照下表于冰上配制反应体系，使用移液器轻轻吸打混匀（避免产生气泡，请勿振荡混匀），短暂离心。

组分	重组反应	阴性对照 1 ^c	阴性对照 2 ^d	阳性对照 ^e
2×Visclone Universal Cloning mix	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
线性化载体（50-200 ng） ^a	X μL	X μL	0 μL	1 μL（pUC19 Control Plasmid, Linearized）
插入片段（50-200 ng） ^b	Y μL	0 μL	Y μL	1 μL（Control Fragment）
ddH ₂ O	Up to 10 μL	Up to 10 μL	Up to 10 μL	Up to 10 μL

a: 最适载体用量(ng) = 0.02 × 载体碱基对数; **b:** 最适片段用量(ng) = 0.04 × 片段碱基对数, 插入多片段, 每片段最适用量(ng) = 0.02 × 片段碱基对数。若插入单片段的长度大于载体, 则应互换载体与插入片段用量; 若插入片段的长度小于 200 bp, 则插入片段应使用 5 倍载体用量; **c:** 检验线性化载体中是否有背景质粒残留; **d:** 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; **e:** 用来排除其他操作因素的影响。

注意:

- a. 在开始操作前应将所有组分轻轻混匀后, 瞬时离心收集到管底, 置于冰上备用;
- b. 若按上述公式计算得到的用量超过最低/最高值, 则建议直接按最低/最高用量使用;
- c. 若载体片段过长、插入片段过长或片段数过多, 克隆阳性率均会降低;
- d. 为了确保加样的准确性, 在配制重组反应体系前可将线性化载体与插入片段适当稀释, 各组分加样量不低于 1 μL。

2. 反应条件

按如下条件进行反应, 反应结束后, 建议进行瞬时离心, 将反应液收集至管底, 将 PCR 管置冰上后直接转化或者保存于 -20°C (可存放 1 周)。

插入片段	反应条件
1~2 个插入片段	50°C, 5-15 min
3~5 个插入片段	50°C, 15-30 min

当载体骨架 > 10 kb 或插入片段 > 4 kb 时, 建议延长反应时间至 30 ~ 60 min。

注意: 推荐使用 PCR 仪等温控较精准的仪器反应, 反应时间不足或太长克隆效率均会降低。

(四) 转化

取 5 μL 反应产物, 按照化学感受态细胞说明书进行转化 (如果转化子较少, 可以将所有产物转化并将所有的转化液涂板)。

(五) 阳性克隆鉴定

- 1. **菌落/菌液 PCR 鉴定:** 用枪头挑取单菌落至 10 μL 无菌水中混匀后取 1 μL 为模板, 或直接蘸取菌落至 PCR 体系中扩增 (建议至少使用一条载体上的通用引物, 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°C, 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 (可选):** 挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中, 37°C, 200 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. **测序：**建议使用载体通用引物测序鉴定。

常见问题与解决方案：

克隆数少或不长克隆：

1. 引物设计有误：引物应包含 16 - 20 bp 同源臂（不计算酶切位点），GC 含量 40% - 60%。设计及合成引物时，注意反向引物的序列顺序。
2. 载体或插入片段纯度差：对载体和插入片段进行胶回收纯化，电泳检测胶回收产物后再进行连接反应；用于重组反应的胶回收产物建议溶解于 ddH₂O 中。
3. 线性化载体或插入片段使用量不足或过量，或者比例不佳：请严格按照说明书推荐的方法计算各组分用量及比例配制反应体系，用琼脂糖凝胶电泳检测样品质量及浓度。
4. 感受态细胞效率低：自制感受态随着保存时间的增加，效率可能会降低，建议尽量使用新鲜感受态或高效的商业化感受态；重组产物的转化体积不应超过感受态细胞体积的 1/10，否则会降低转化效率；选择克隆用感受态细胞（如 DH5 α /XL10），不能选择表达感受态细胞。

多数克隆不含插入片段或含有不正确的插入片段：

1. 克隆载体及片段中含有质粒背景：可通过阴性对照检测载体是否线性化完全，优化酶切体系，酶切制备线性化载体时，提高快速内切酶的使用量，延长反应时间，胶回收纯化酶切产物；制备插入片段时尽量使用预线性化质粒作为扩增模板，扩增产物进行 *Dpn* I 消化及凝胶回收纯化。
2. 反应体系中混入了相同抗性的质粒：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。
3. PCR 产物中混有非特异性扩增产物：推荐优化 PCR 体系，提高特异性，使用凝胶回收 PCR 产物，鉴定更多的克隆。

菌落 PCR 无条带或大小不对：

1. 引物不正确：推荐使用载体的通用引物或至少使用一条通用引物进行菌 P 鉴定。
2. 假阴性结果（插入片段较大）：建议提取质粒为模板进行 PCR 验证或酶切验证。优化 PCR 体系、程序。
3. 重组失败：只有空质粒的条带，说明重组不成功，载体线性化不完全，建议优化载体及片段质量。