

Version: AK 6.0 (2024.08.15修订)

Spark HiFi Seamless Cloning Kit (1-5个片段)

目录号: AK0601

01/产品组分

组分	AK0601-A (20 rxn)	AK0601-B (50 rxn)
2×Spark HiFi Seamless Cloning Mix	100 μL	250 μL
Linearized Control Vector (3 kb 40 ng/μL)	5 μL	5 μL
Control Insert (800 bp 20 ng/μL)	5 μL	5 μL
M13 F/R Primer Mix (10 μM)	20 μL	50 μL

02/保存条件

-20°C保存, 避免反复冻融。

03/产品概述

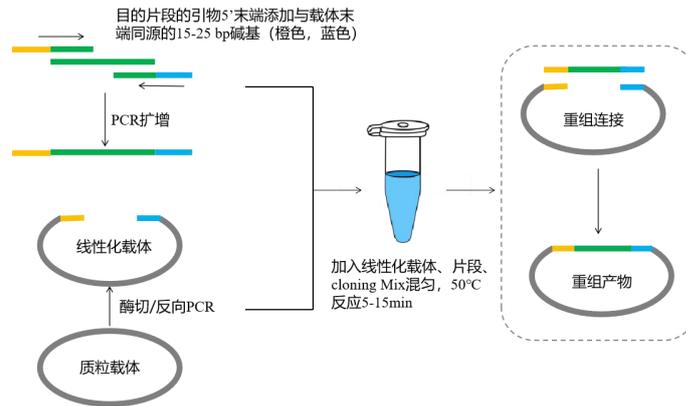
无缝克隆试剂盒不依赖于T4连接酶, 不受载体和目的片段酶切位点限制, 直接采用重叠片段重组的方法, 采用特殊的酶组合可以将任意方法线性化后的载体和两端具有15-25 bp重叠区域的PCR片段定向重组连接, 可快速实现1-5个片段的高效无缝克隆。

04/产品特点

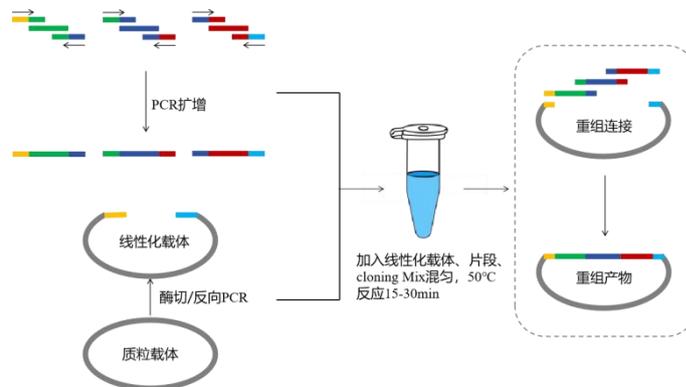
- 一管式预混 Mix, 操作简便, 带有阳性对照载体、片段、阳性对照鉴定引物。
- 5min 可实现单片段连接, 15-30min 可实现多个片段连接, 连接效率可达 95%。
- 不受载体和插入片段酶切位点的限制, 可在任意位点进行克隆。

05/产品原理

1. 单片段克隆原理示意图：



2. 多片段克隆原理示意图：



06/线性化载体和插入DNA片段的制备

1. 线性化载体的制备

选择合适的克隆位点，对载体进行线性化：尽量选择无重复序列且 GC 含量适中的区域进行克隆。载体的克隆位点上下游 20 bp 区域内 GC 含量在 40-60%之间时组装效率最大。

(1) 酶切制备线性化载体：单酶切或双酶切均可，酶切后胶回收获得平末端或粘末端线性载体。

▲无缝克隆反应体系内无双链 DNA 连接酶，不会发生载体自连，线性化的载体无需进行末端去磷酸化处理。重组产物转化后出现假阳性克隆是由未线性化的环状载体转化而形成的，因此酶切制备线性化载体建议使用双酶切，且使用胶回收的方法处理酶切产物，有利于降低假阳性。

(2) 反向 PCR 制备线性化载体：建议使用高保真 DNA 聚合酶（货号：AF0802/AF0803）制备，扩增产物可通过 PCR 产物纯

化/胶回收（货号：AE0101）获得载体。

- ▲反向 PCR 的质粒模板是非线性化载体，可能导致假阳性克隆，50 μL 的 PCR 体系中，推荐使用 0.1 - 1 ng 环状质粒作为模板；
- ▲建议 PCR 产物纯化前用 *Dpn I* 内切酶消化环状质粒模板，可以降低背景，提高阳性率。但一般情况下，通过胶回收足以把未线性化载体比例降到最低，因此反向 PCR 来源的线性化载体也推荐胶回收。

2. 插入 DNA 片段的制备

◆单个插入片段克隆引物设计：

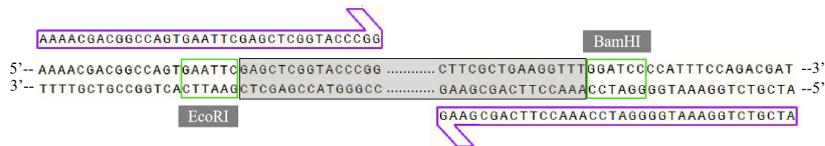
引物设计总原则：在插入片段引物的5'端引入线性化载体两端的同源序列，使扩增获得的插入片段5'和3'末端分别带有和线性化载体两末端对应的完全一致的同源序列（15-25 bp）。

▲正向扩增引物：5'-上游载体末端同源序列+酶切位点（可保留或删除）+插入片段正向特异性引物序列-3'

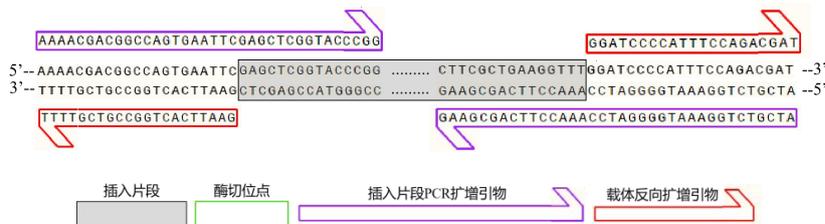
▲反向扩增引物：5'-下游载体末端同源序列+酶切位点（可保留或删除）+插入片段反向特异性引物序列-3'

以 pUC19 作为载体为例，引物设计方案如下图所示：

(a) 载体选用双酶切线性化（*EcoR I/BamH I*）



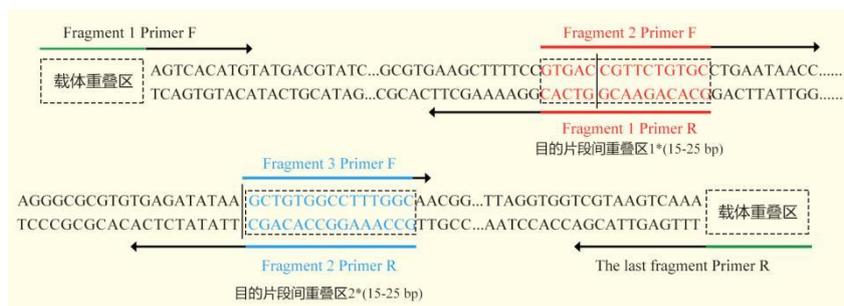
(b) 载体选用反向 PCR 线性化



▲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，载体末端同源序列不参与计算（推荐引物 T_m 值为 60-65℃）。

◆多个插入片段的克隆引物设计：

与载体两端连接的插入片段引物设计方法同单片段设计方法，片段与片段之间连接的插入片段引物设计方法见下图：



▲多个插入片段之间重叠区设计有上述*标记(蓝色和红色)的两种方式,在多片段引物设计时,选择任意一种方式或两种方式混用均可,只要保证片段与片段之间有15-25 bp的重叠区即可。

3. 插入片段 PCR 扩增

建议使用高保真 DNA 聚合酶(货号: AF0802/AF0803)进行扩增,以减少突变的引入。扩增反应条件按照具体使用的聚合酶说明书进行即可。

4. 纯化插入片段

建议使用胶回收试剂盒(货号: AE0101)纯化片段。

▲可选: 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。

▲如果片段单一,建议用PCR产物纯化试剂盒(货号: AE0101)纯化片段。

▲如果有非特异扩增,建议用胶回收试剂盒(货号: AE0101)回收片段。

▲如果重组质粒用于蛋白表达,则在引物设计时需注意保证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。

07/无缝克隆反应的操作步骤

1. 线性化载体与插入片段使用量计算

◆单片段克隆:

10 μL反应体系中,线性化载体的最适使用量为0.03 pmol,插入片段与线性化载体的摩尔比控制在2:1-3:1,推荐添加摩尔比为2:1。

▲以片段和载体摩尔比为 2:1 为例:

最适克隆载体使用量(0.03 pmol) = $[0.03 \times 0.65\text{kDa} \times \text{碱基对数}] \text{ ng} = [0.02 \times \text{碱基对数}] \text{ ng}$;

最适插入片段使用量(0.06 pmol) = $[0.06 \times 0.65\text{kDa} \times \text{碱基对数}] \text{ ng}$;

例如,将长度为 2 kb 的插入片段克隆至长度为 5 kb 的克隆载体时,克隆载体使用量(0.03 pmol) = $0.02 \times 5000 = 100 \text{ ng}$;

插入片段使用量(0.06 pmol) = $0.06 \times 0.65\text{kDa} \times 2000 = 78 \text{ ng}$ 。

▲如果插入片段小于 200 bp,建议插入片段与线性化载体的摩尔比为 5:1。

▲如果插入片段长度大于线性化载体长度,建议将线性化载体看做插入片段,将插入片段看做载体计算。

▲对于单片段同源重组反应,插入片段的使用量应大于 20 ng,按照公式计算出不足 20 ng 的按照 20 ng 计算。

◆多片段克隆:

10 μL反应体系中,线性化载体的最适使用量为0.03 pmol,各个插入片段与线性化载体的摩尔比均控制在2:1-3:1,推荐添加摩尔比为3:1。

▲连接效率随片段数量和连接产物总长度的增加而降低。

▲对于多片段同源重组反应,插入片段的使用量应大于 10 ng,按照公式计算出不足 10 ng 的按照 10 ng 计算。

▲多片段克隆计算举例(以片段和载体摩尔比为 3:1 为例):

最适克隆载体使用量(0.03 pmol) = $[0.03 \times 0.65\text{kDa} \times \text{碱基对数}] \text{ ng} = [0.02 \times \text{碱基对数}] \text{ ng}$;

最适插入片段使用量(0.09 pmol) = $[0.09 \times 0.65\text{kDa} \times \text{碱基对数}] \text{ ng}$;

将长度分别为 0.5 kb、1 kb、2 kb 的插入片段克隆至长度为 5 kb 的克隆载体时，载体与各片段最适使用量为：

线性化载体使用量（0.03pmol）： $0.02 \times 5,000 = 100 \text{ ng}$ ；

0.5 kb 插入片段使用量： $0.09 \times 0.65 \text{ kDa} \times 500 = 29 \text{ ng}$ ；

1 kb 插入片段使用量： $0.09 \times 0.65 \text{ kDa} \times 1000 = 59 \text{ ng}$ ；

2 kb 插入片段使用量： $0.09 \times 0.65 \text{ kDa} \times 2000 = 117 \text{ ng}$ ；

2. 配制连接体系（推荐使用 PCR 管在冰上操作）

Components	样品	阳性对照 (选做)	阴性对照 1 (选做)	阴性对照 2 (选做)
2×Spark HiFi Seamless Cloning Mix	5 μL	5 μL	--	--
Linearized Vector	X μL	--	X μL	--
Insert 1···N (N≤5)	Y μL	--	--	Y μL
Linearized Control Vector (40 ng/μL)	--	1.5 μL	--	--
Control Insert (20 ng/μL)	--	1.6 μL	--	--
dd H ₂ O	To 10 μL	To 10 μL	To 10 μL	To 10 μL

▲2×Spark HiFi Single Seamless Cloning Mix 含有连接增强剂 PEG，质地粘稠，温度低时更粘稠，从冰箱取出后可放在手心化冻几分钟提高温度降低粘稠度（不影响质量），轻弹混匀并瞬时离心使液体集中在管底。

▲为了保证加样的准确性，重组体系各组分的添加量不低于 1 μL，若浓度过高，可进行适当稀释。

▲阳性对照反应可用来排除其他实验材料及操作因素的影响。阴性对照 1 用于检测线性化载体中是否含有环状质粒残留；阴性对照 2 用于当 PCR 扩增模板为与克隆载体抗性相同的环状质粒时，检测有无环状质粒残留。

3. 轻轻混匀并瞬离，单片段无缝连接推荐 50°C 反应 5-15 min（推荐在 PCR 仪中进行），多片段无缝连接推荐 50°C 反应 15-30 min。反应结束后置于冰上，反应产物可直接转化感受态细胞或保存于 -20°C。

▲单片段连接时，5min 即可获得足够数量的转化子，若片段较长或对克隆数要求较高时，可延长至 15min。

▲多片段连接时，可适当延长反应时间，但最长不要超过 60 min。

4. 重组产物转化感受态细胞

以常规化学转化为例，可参考所使用感受态细胞说明书。

- ◆将克隆用的感受态细胞置于冰上解冻。
- ◆取 5 μL 重组产物加入 50 μL 感受态细胞（重组产物体积 ≤ 感受态体积的 1/10），轻弹管壁混匀，不要剧烈吹打，冰浴 30 min。
- ◆42°C 热激 45-60 sec 后，立即置于冰上静置 2min，期间不要晃动离心管。
- ◆加入 800 μL 不含抗生素的 LB 液体培养基，于 37°C，200 rpm 恒温振荡培养 40-60 min。
- ◆将培养好的菌液 4000 rpm 离心 3 min，吸弃 500 μL 上清，用剩余培养基重悬菌体，吹打混匀后，均匀涂布至含相应抗性的 LB 固体培养基（本产品自带的阳性对照载体为氨苄青霉素抗性）。
- ◆37°C 倒置培养 12-16 h。

08/阳性克隆的鉴定

可根据具体情况，选择菌落 PCR 鉴定、菌液 PCR 鉴定、提取质粒进行酶切鉴定或测序鉴定。

09/相关产品

- AD0102 SPARKeasy 高纯质粒小量快速提取试剂盒
- AE0101 胶回收/PCR 产物纯化试剂盒
- AJ0101 Spark 2000 DNA Marker
- AJ0205 Agarose
- AJ0208 Spark GoldView
- AF0802 2×SparkHiFi Max Master Mix (with dye)
- AF0102 2×Spark Taq PCR Master Mix (with dye)
- AK0603 Spark HiFi Seamless Cloning Kit (单片段)

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

