



## ABP One Step Cloning Kit

货号: D017-01, D017-02

表 1. 试剂盒组分和储存条件

材料	体积	储存条件	有效期
<b>ABP One Step Cloning Kit (货号 D017-01, 25T)</b>			按照推荐的储存条件保存有效期为6个月, 请注意避免反复冻融。
5x Clone Master Mix	50 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 避免反复冻融	
<b>ABP One Step Cloning Kit (货号 D017-02, 50T)</b>			
5x Clone Master Mix	100 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 避免反复冻融	

### 产品介绍

ABP One Step Cloning Kit是一种简单、快速并且高效的DNA重组无缝克隆试剂盒, 可以实现一至四个片段同源重组。该方法首先将载体进行线性化, 在插入片段正/反向PCR引物5'端引入线性化载体的末端序列, 使得PCR产物5'和3'最末端分别带有和线性化载体两末端一致的序列 (15 - 20 bp)。这种两端带有载体末端序列的PCR产物和线性化载体按一定比例混合后, 在重组酶的催化下, 50 $^{\circ}$ C反应 5 - 15 min 即可进行转化, 完成定向克隆。该试剂盒独特的非连接酶依赖体系, 极大地降低了载体自连背景, 且无需考虑插入片段自身携带的酶切位点。高度优化的5x Clone Master Mix体系, 可显著提高克隆的重组效率与对杂质的耐受度, 使得线性化载体与插入片段不进行纯化直接用于重组克隆成为可能, 极大的简化了实验步骤。

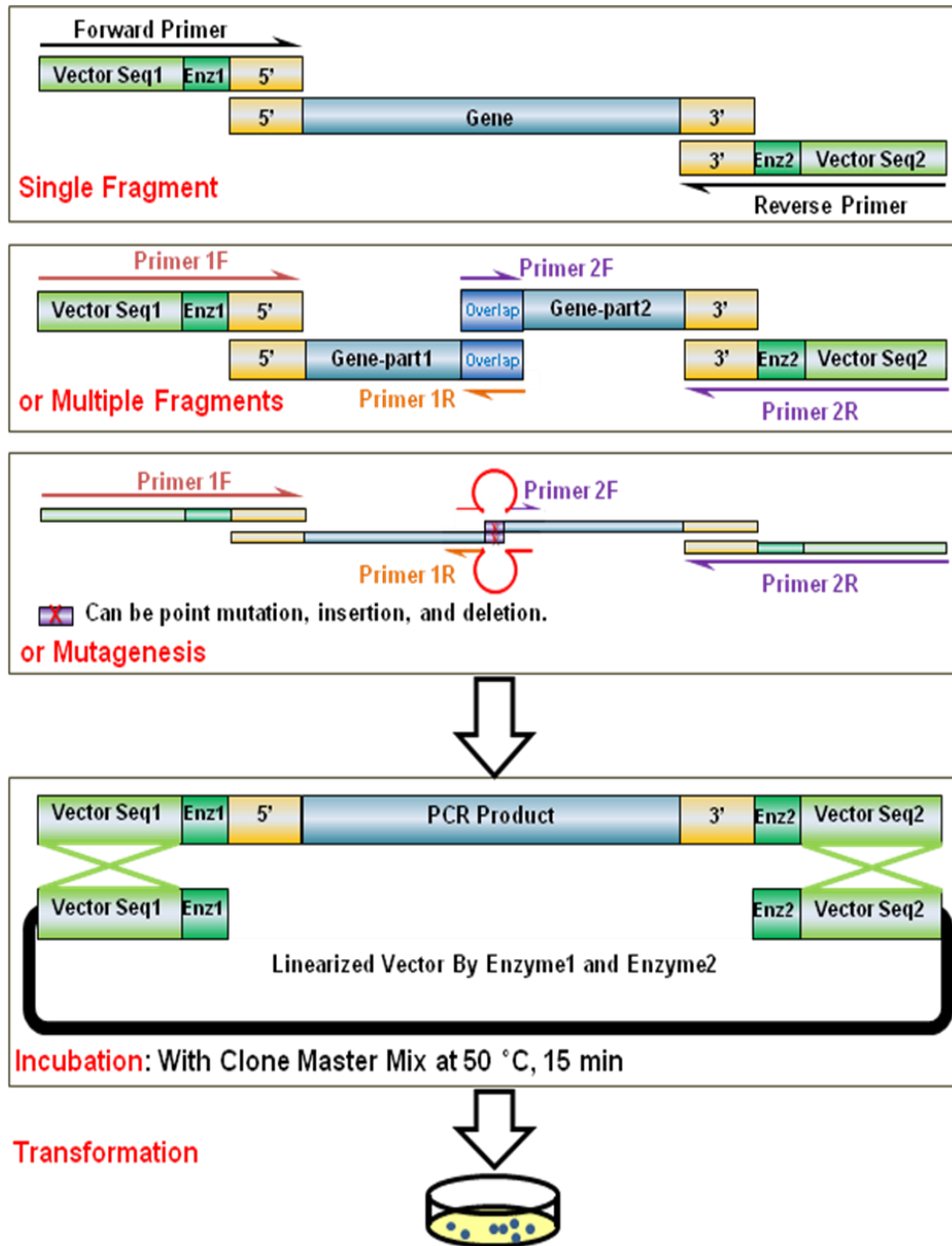
### 应用范围:

- 无缝克隆
- 快速克隆
- 高通量克隆
- DNA定点突变

### 实验所需材料 (不包含在试剂盒中)

- 线性化载体
- 片段扩增用模板、引物
- 高保真聚合酶
- 感受态细胞
- 其他材料: ddH<sub>2</sub>O、PCR管、PCR仪等

## 实验流程



1. 载体线性化：通过酶切或反向PCR获得线性化载体。
2. 插入片段获得：由PCR制备，所用扩增引物在设计时需在其5'端添加同源序列，使得扩增产物之间以及扩增产物与线性化载体之间各有一段同源序列。
3. 重组反应：将线性化载体和各插入片段按比例混合，在重组酶催化下，50°C反应15min即可完成重组反应，实现多个线性化DNA的体外环化。
4. 转化感受态细胞：重组产物直接进行转化，平板上会形成数百个单克隆供后期阳性筛选。



## 实验步骤

### 1. 载体线性化

1.1. 选择合适的克隆位点，对载体进行线性化。推荐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20bp区域内GC含量均在40% - 60%之间时，重组效率将达到最大。

1.2. 载体线性化方式：可以选择限制性内切酶酶切消化，或反向PCR扩增。

酶切制备线性化载体时，推荐使用双酶切方法使载体线性化完全，降低转化背景(假阳性克隆)；若使用单酶切线性化，请适当延长酶切时间以减少环状质粒残留，降低转化背景。

反向PCR扩增制备线性化载体时，推荐使用高保真聚合酶2xABP HiFi PCR Master Mix (ABP Cat No. D019)进行载体扩增，以减少扩增突变的引入。50 $\mu$ l的PCR反应体系中，推荐使用0.1 - 1 ng 环状质粒模板，或使用预线性化质粒作为模板，以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。

**Note:** 以环状质粒为模板时，PCR产物需使用Dpn I进行消化，以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。

### 2. 插入片段获得

2.1. 引物设计的总原则：通过在引物5'端引入同源序列，使扩增产物之间以及扩增产物与线性化克隆载体之间都具有能够相互同源重组的完全一致的序列(15 - 20 bp，不包括酶切位点)。

#### 单片段扩增引物设计方案

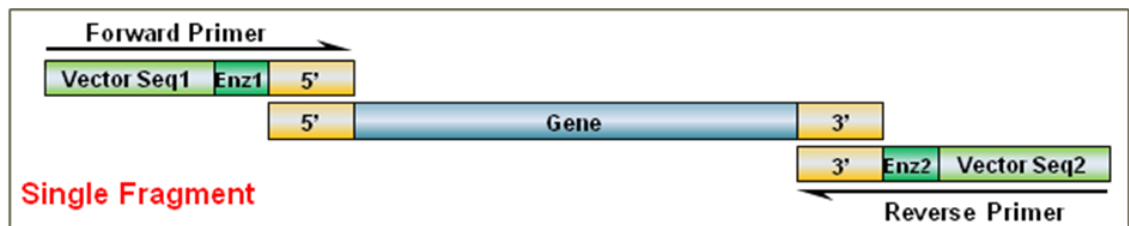
插入片段正向扩增引物设计方式为：

5'--上游载体末端同源序列 + 酶切位点(可保留或删除) + 基因特异性正向扩增引物序列--3'

插入片段反向扩增引物设计方式为：

5'--下游载体末端同源序列 + 酶切位点(可保留或删除) + 基因特异性反向扩增引物序列--3'

**Note:** 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<sub>m</sub>值60~65 °C为佳，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<sub>m</sub>值，引入的同源序列及酶切位点不应参与计算；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%-60%为佳；如果最终引物长度超过40 bp，推荐在引物合成时选用PAGE纯化，可提高克隆成功率。



#### 多片段扩增引物设计方案

最上游片段正向扩增引物设计方式为：

5'--上游载体末端同源序列 + 酶切位点(可保留或删除) + 基因特异性正向扩增引物序列--3'

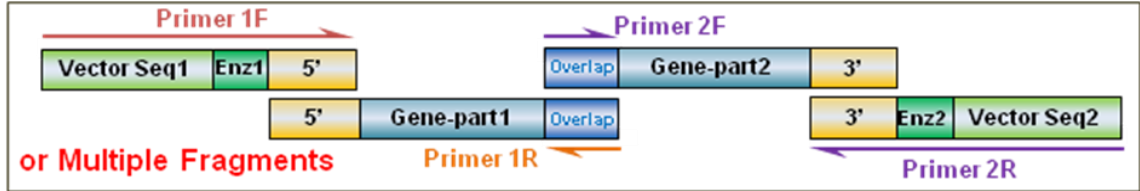
最下游片段反向扩增引物设计方式为：

5'--下游载体末端同源序列 + 酶切位点(可保留或删除) + 基因特异性反向扩增引物序列--3'

中间各插入片段之间的引物设计方式有以下三种：

- A. 以前一片段3'端15 - 20 bp 作为同源序列添加至后一片段5'端；
- B. 以后一片段5'端15 - 20 bp 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15 - 20 bp)，分别添加至另一片段末端。

**Note:** 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<sub>m</sub>值60~65 °C为佳，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<sub>m</sub>值，引入的同源序列及酶切位点不应参与计算；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%-60%为佳；如果最终引物长度超过40 bp，推荐在引物合成时选用PAGE纯化，可提高克隆成功率。



## 2.2. 插入片段PCR扩增。

为了减少扩增突变的引入，推荐使用高保真聚合酶2×ABP HiFi PCR Master Mix (ABP Cat No. D019) 进行扩增。

## 3. 线性化载体与插入片段的使用量

### 3.1 浓度测定：

若线性化载体与各插入片段已通过高质量的试剂盒进行胶回收纯化，且经电泳检测无明显杂带或Smear残留时，可使用Nanodrop等基于吸光度的仪器进行浓度测定，但只有当A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>在1.8 - 2.0之间时浓度值可信。当样品浓度低于10 ng/μL时，推荐使用Qubit®荧光定量法进行浓度测定。

未经纯化的线性化载体或各插入片段，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。

### 3.2 载体、片段使用量计算：

#### 对于单片段同源重组反应：

最适克隆载体使用量 = [0.02 × 克隆载体碱基对数] ng (0.03 pmol)

最适插入片段使用量 = [0.04 × 插入片段碱基对数] ng (0.06 pmol)

例如，将长度为1 kb的插入片段克隆至长度为5 kb的克隆载体时，克隆载体的最适使用量为：0.02 × 5000 = 100 ng；插入片段的最适使用量为：0.04 × 1000 = 40 ng。

#### 对于多片段同源重组反应：

最适克隆载体使用量 = [0.02 × 克隆载体碱基对数] ng (0.03 pmol)

各片段的最适使用量 = [0.02 × 各片段碱基对数] ng (0.03 pmol)

例如，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：

线性化克隆载体的最适使用量为：0.02 × 5000 = 100 ng；

0.5 kb插入片段的最适使用量为：0.02 × 500 = 10 ng；



1 kb插入片段的最适使用量为： $0.02 \times 1000 = 20 \text{ ng}$ ；

2 kb插入片段的最适使用量为： $0.02 \times 2000 = 40 \text{ ng}$ 。

**Note:** a. 线性化克隆载体的使用量应在50 - 200 ng之间。当使用上述公式计算DNA最适使用量超出这个范围时，直接选择最低/最高使用量即可。

b. 对于单片段同源重组反应，插入片段的使用量应大于20 ng。

c. 对于多片段同源重组反应，插入片段的使用量应大于10 ng。当使用上述公式计算最适使用量低于这个值时，直接使用10 ng即可。

d. 对于单片段同源重组反应，PCR产物无非特异性扩增条带时，可不进行DNA纯化直接使用，加入总体积应不超过反应体系体积的1/5，即2  $\mu\text{l}$ ，但重组效率会降低。

#### 4. 重组反应

##### 4.1 根据公式计算重组反应所需DNA量。

为了确保加样的准确性，在配制重组体系前可将线性化载体与插入片段做适当稀释，各组分加样量不低于1  $\mu\text{l}$ 。

##### 4.2 于冰上配制以下反应体系：

组分	重组反应	阴性对照 -1 <sup>b</sup>	阴性对照 -2 <sup>c</sup>
线性化载体 <sup>a</sup>	X $\mu\text{l}$	X $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$
N个插入片段 <sup>a</sup>	Y <sub>1</sub> -Y <sub>n</sub> $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$	Y <sub>1</sub> -Y <sub>n</sub> $\mu\text{l}$
2x Clone Master Mix	2 $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$	0 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	to 10 $\mu\text{l}$	to 10 $\mu\text{l}$	to 10 $\mu\text{l}$

a. X/Y根据公式计算得到载体用量和各插入片段用量。

b. 阴性对照-1可用来确认线性化克隆载体中有无环状质粒残留，推荐进行。

c. 阴性对照使用移液器轻轻吸打混匀(请勿振荡混匀)，短暂离心将反应液收集至管底。

##### 4.3 50°C反应15 min；降至4°C或立即置于冰上冷却。

**Note:** a. 推荐在PCR仪等温控比较精确的仪器上进行反应。

b. 重组产物可于-20°C存放一周，待需要时解冻转化即可。

#### 5. 重组产物转化

5.1 在冰上解冻克隆用的化学感受态细胞。

5.2 取5-10  $\mu\text{l}$ 重组产物加入到100  $\mu\text{l}$ 感受态细胞中，轻弹管壁混匀(请勿振荡混匀)，冰上静置 30 min。

**Note:** 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。

5.3 42°C水浴热激45 sec后，立即置于冰上冷却2-3 min。

5.4 加入900  $\mu\text{l}$  SOC或LB培养基(不添加抗生素)，37°C摇菌1 h (转速200 - 250 rpm)。

5.5 将相应抗性的LB平板固体培养基在37°C培养箱中预热。

5.6 5,000 rpm离心5 min，弃掉900  $\mu\text{l}$ 上清。用剩余培养基将菌体重悬，用无菌涂布棒在含有正确抗性的平板上轻轻涂匀。

5.7 37°C培养箱中倒置培养12-16 h。

#### 6. 重组产物鉴定

6.1 过夜培养后，重组反应转化平板上形成数百个单克隆，而阴性对照反应转化平板上的克隆数应显著少于前者(Fig 1)。

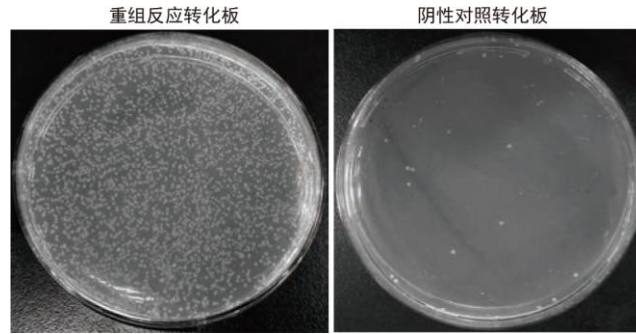


Fig 1. 过夜培养的平板

6.2 挑取重组反应转化平板上若干个克隆进行菌落PCR鉴定，扩增引物至少使用一条载体上的通用测序引物。如果克隆正确，应有长度略大于插入片段大小的条带出现(Fig 2)。

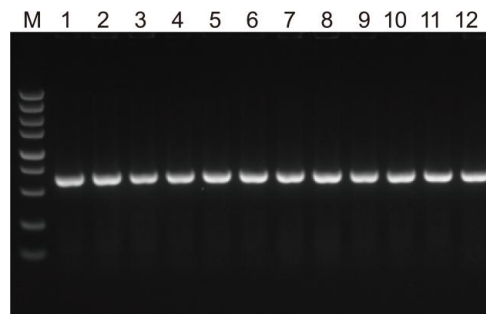


Fig 2. 菌落PCR琼脂糖凝胶电泳检测

6.3 菌落PCR鉴定为阳性的菌落，可再将剩余菌液接种至含有适当抗生素的液体LB培养基中培养过夜，提取质粒进行酶切鉴定(Fig 3)，或直接进行一代测序。

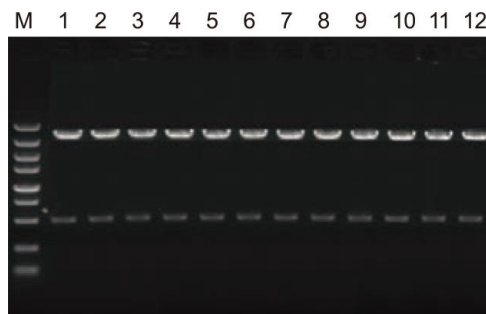


Fig 3. 酶切产物琼脂糖凝胶电泳检测



## 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，推荐使用商业化的超级感受态(转化效率 $>10^8$  cfu/ $\mu$ g)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. ABP One Step Cloning Kit试剂盒可高效克隆50 bp - 10 kb片段。
3. 载体和插入片段的使用方式：

### 片段数较少(2 - 3个插入片段)且片段总长度较短(<5 kb)时：

- a. 酶切线性化的载体可通过加热失活内切酶(绝大多数内切酶适用，具体失活方式参见内切酶使用说明书)后直接用于重组反应；
- b. 反向PCR扩增制备的线性化载体，如扩增模板经预线性化处理且PCR产物电泳条带单一，扩增产物可以无需纯化直接用于重组反应。
- c. 对于插入片段，若琼脂糖电泳检测结果显示扩增产量足够且条带特异，同时扩增模板不是与克隆载体抗性相同的环状质粒，扩增产物可以无需纯化直接用于重组反应。不同情况下线性化载体与插入片段的使用方法可查阅Table 1 / Table 2。

Table 1. 线性化载体的使用方法

线性化载体制备方式	模板类型	快速实验方案	最佳实验方案
酶切消化制备	环状质粒	加热失活内切酶后直接使用	胶回收
PCR制备	环状质粒	<i>Dpn</i> I消化后直接使用 (降解扩增模板)	胶回收或者 <i>Dpn</i> I消化后胶回收
	预线性化质粒、 基因组、cDNA	直接使用	胶回收
	有明显 非特异性扩增	胶回收	

Table 2. 扩增产物的使用方法

PCR扩增情况	PCR模板类型	快速实验方案	最佳实验方案
特异性扩增	与克隆载体抗性相同的 环状质粒	<i>Dpn</i> I消化后直接使用 (降解扩增模板)	胶回收或者 <i>Dpn</i> I消化后胶回收
	预线性化质粒、 基因组、cDNA	直接使用	
有明显 非特异性扩增		胶回收	

**Note:** 直接使用酶切产物或扩增产物进行重组反应时，使用体积不应超过2  $\mu$ l (重组反应总体积的1/5)。插入片段扩增产物经*Dpn*I消化后，85 $^{\circ}$ C加热20 min失活*Dpn*I活性，以避免重组反应时残留*Dpn*I对克隆载体的降解。

### 片段总长度较长(>5 kb)时：

推荐使用高质量的胶回收试剂盒对线性化载体和片段扩增产物进行纯化，提高载体和插入片段的纯度。

## 常见问题与解决方案

### 1. 载体的线性化问题

载体的线性化方式有三种：双酶切、单酶切、反向PCR，优先选择双酶切。

### 2. 引物设计问题

引物三部分：同源臂(15 - 20 bp, GC含量40% - 60%)+ 酶切位点(根据实验需求保留或者删除) + 特异性引物(引物Tm值的计算不包括同源臂的序列)。

### 3. 平板上未长出克隆或克隆数目很少。

- 引物设计不正确：引物包含15 - 20 bp同源臂(不计算酶切位点)，GC含量40% - 60%。
- 线性化克隆载体和插入片段扩增产物的用量不足/过量，或者比例不佳：尽量按照说明书中推荐的量和比例配制重组反应体系。
- 载体和插入片段不纯，抑制反应：未纯化DNA使用体积不应超过2  $\mu$ l (反应体系体积的1/5)；建议线性化载体、PCR产物进行凝胶回收纯化，纯化产物溶解在pH 8.0的ddH<sub>2</sub>O中。
- 感受态细胞效率低：感受态细胞的转化效率需大于10<sup>8</sup> cfu/ $\mu$ g。可进行简单检测，转化0.1 ng质粒，取1/10进行涂板，生长1000个菌斑，估算转化效率为10<sup>8</sup> cfu/ $\mu$ g；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 $\alpha$ /XL10)，不能选择表达感受态细胞。

### 4. 多数克隆不含插入片段或含有不正确的插入片段。

- PCR产物混有非特异扩增产物：优化PCR体系，提高特异性；胶回收PCR产物；鉴定更多的克隆。
- 克隆载体线性化不完全：可通过阴性对照检测载体是否线性化完全，优化酶切体系，提高限制性内切酶用量、延长酶切反应时间、胶回收纯化酶切产物。
- 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。

### 5. 菌落PCR无条带。

- 引物不正确：推荐使用载体的通用引物进行菌检，或至少使用一条通用引物。
- PCR体系或程序不合适：没有目的条带也没有空质粒条带，建议优化PCR体系、程序；或者提取质粒，以质粒做模板PCR验证；或者进行酶切验证。
- 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，建议优化酶切体系。