



ShinoRec®一步法定向克隆

试剂盒（无缝克隆试剂盒）说明书

目 录

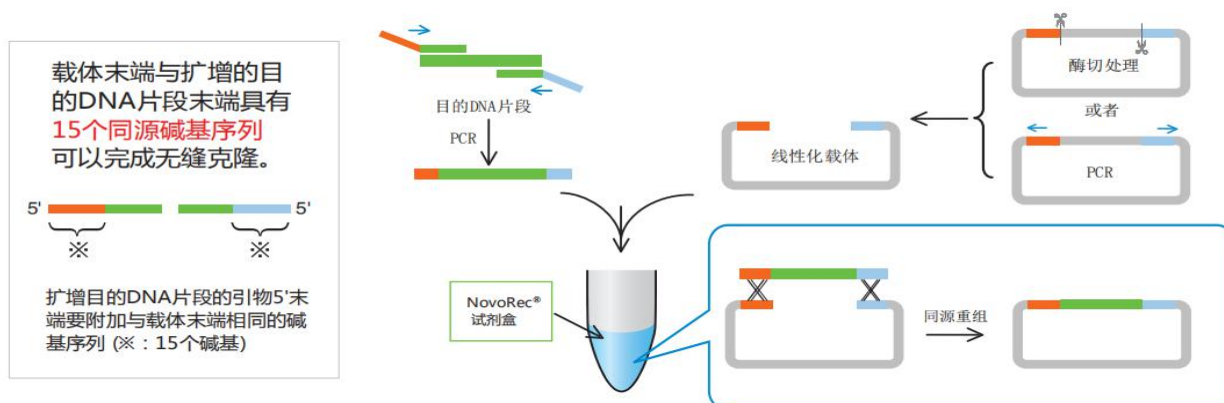
A. ShinoRec®一步定向克隆试剂盒（无缝克隆试剂盒）说明书.....	2
B. 技术手册.....	6
1. 引物设计.....	6
1.1. 多片段引物设计方法.....	6
1.2. 载体或目的片段末端上有多余非同源片段时如何设计引物？	6
2. 重组构建.....	6
2.1. 载体与目的片段摩尔比的计算.....	7
2.2. 线性化载体的浓度.....	7
2.3. 不同大小目的片段的重组效率？	7
2.4. 如果载体过大，怎么处理？	7
2.5. 插入片段过大如何处理？.....	7
2.6. 单酶切（黏性末端，平末端）载体片段的处理，是否影响阳性率？	7
3. 常见困难分析.....	8
3.1. Taq 末端加 A 影响阳性率吗？	8
3.2. 同源序列不完全匹配会不会影响重组？	8
3.3. 转化不长，是什么原因？	8
3.4. 转化后长得很好，就是没有阳性，是什么原因？	8
3.5. 鉴定有阳性，但是测序不是目的基因，为什么？	8
3.6. 阳性克隆测序后发现在序列的引物处有碱基突变，是什么原因引起的？	8



一、产品介绍

ShinoRec®一步定向克隆试剂盒（无缝克隆试剂盒），该产品可以不依赖于连接酶，不受载体和目的片段的酶切位点限制，而直接用同源重组的方法，完成目的片段与载体相连接的基因克隆技术。该技术操作简单，PCR 产物一步定向克隆，目的片段与载体无缝连接，反应时间短至 20 分钟，阳性率达到 95%以上，让您轻松完成实验。

二、反应原理



三、产品组成及保存条件

3.1. 产品组成

货号	WF010S	WF010M	
产品组成	包装规格(20 次)	包装规格(100 次)	数量
ShinoRec® 重组酶	20 μ l/管	100 μ l/管	1 管
ShinoRec®10 $\times$ 反应缓冲液	50 μ l/管	250 μ l/管	1 管

3.2. 保存条件

收到后请立即低速离心保存在-20℃；此 Kit 可在-20℃长期保存，避免反复冻融。

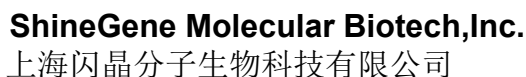
四、使用方法

4.1. 载体的制备

选取合适的位点，单酶切，双酶切或 PCR 扩增皆可，并且 5'端突出，3'端突出或平末端均适用本 Kit。由于单酶切线性化程度差，且为了提高阳性率，我们建议您采取双酶切载体。最终载体的浓度>15ng/ μ l。（高浓度的载体有利于提高效率）。

4.2. 引物设计

使用 ShinoRec®一步定向克隆试剂盒（无缝克隆）时，引物设计是很重要的，总的原则是通过引物 5'端引入同源重组序列，扩增产物之间以及扩增产物与线性化克隆载体之间都具备能够相互同源重组的完全一致的序列。即在遵循引物设计基本原则的前提下，只需在上下游引物要加上 15-20bp 的载体同源序列。具体参考下图：



1. 载体切开后为平末端:

Forward Primer EcoR V

5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNGATATCxxx.....

5'-...NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGAT ATC NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN...-3'

3'-...NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAT TAG NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN...-5'

...xxxCTATAGNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5'

EcoR V Reverse Primer

2. 载体切开后5'端突出:

[illegible]

3. 载体切开后3'端突出:

Forward Primer *Pst* I

5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGCAGxxx.....

5'-...NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGCA NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN...-3'

3'-...NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN ACGTCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN...-5'

...xxxGACGTCNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5'

Pst I Reverse Primer

同源序列和酶切位点

4.3. 目的片段的获得

目的片段通常通过 PCR 获得，为保证 PCR 扩增的特异性及灵敏度，请尽可能选用 pfu 等高保真酶，推荐使用 ShineGene Fast Pfu DNA 聚合酶（货号：ZP02033）。PCR 每条引物长度至少在 40-45bp，包括 5'端与载体同源的 15-20bp 以及目的片段特异性序列 20-25bp（注意事项：如果是表达载体克隆构建，引物设计完成后，请注意检查读码框是否正确）。

注：PCR 扩增结束后如有杂带，需割胶回收，否则杂带会影响重组反应。

4.4. 目的基因与载体的重组

1. 于冰盒上将目的片段与线性化载体以一定的摩尔比加入到离心管中进行重组反应，反应体系见下表。

试剂	加量
ShinoRec®10×反应缓冲液	2
ShinoRec®重组酶	1
线性化载体 (>15ng/ μl)	N
插入片段	N
ddH2O	加至 20 μl

2. 轻微混匀后，在 **30℃** 反应 20-30 分钟，如不慎将液体粘到管壁上，可通过短暂低速离心使其沉入管底。如果插入片段>3 段，建议 **30℃** 度反应 1h。

Add: Floor 2, Gate 6, 289#, Mingqiang Road, Songjiang District, Shanghai 201612

Tel: +86-21-54460832

Fax: +86-21-54460831

Web: www.synthesisgene.com

E-mail: master@shinegene.org.cn



3. 反应结束可直接进行转化，若不转化需储存在 4℃或-20℃。

注：当载体的加量至 80-100ng 时，可获得较高重组率！

4.5. 反应产物转化、涂板

我们建议所使用的感受态细胞效率要达到或 $>5 \times 10^6$ cfu/ μ g。转化步骤如下：

1). 冰上融化一管 100 μ l 的 DH5a 感受态细胞，轻弹管壁使细胞重悬起来。加入 10 μ l 的反应液到感受态细胞中，轻弹数下，冰浴 30min。

2). 42℃水浴中热激 90 秒后快速放入冰上 5 分钟。

3). 加入 500 μ l 无抗 SOC 或 LB 液体培养基，37℃孵育 45-60 分钟。

4). 5000rpm 离心 3 分钟收集菌体，根据需要将一定量的菌体均匀的涂布在含抗生素平板上。

注：为了验证载体酶切完全，建议做转化的同时做一个空载体作为对照。在载体处理好的情况下，对照应无克隆生长！

4.6. 阳性克隆鉴定

一般的，我们建议采用菌落 PCR 进行阳性克隆鉴定。

鉴定引物的选择：为了避免假阳性结果，我们建议一条引物为载体特异性引物，另一条引物为目的片段特异性引物。

五、参照实例

实验目标：在 PNPM5 载体的 EcoR I 和 Hind III 酶切位点间插入一段基因，长度为 4kb。

5.1. 目的片段引物设计

根据引物设计方案，设计 4kb 的正向扩增引物和反向扩增引物，如下图：

部分载体序列：

```
5'...TCCAAGTTTAAACGGATCTCTAGCGAATTC xxxxxx.....AAGCTTGCTAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGC....3'
3'...AGGTTCAAATTTGCCTAGAGATCGCTTAAG xxxxxx.....TTCGAACGATCGCCGGCGAGCTCCGGCCGTTCCG....5'
```

引物序列：

4K 的正向扩增引物：5'...GTTTAAACGGATCTCTAGCGAATTCCCAGGATGGCGAACAACAAGAA...3'
20bp 同源序列 与目的基因结合序列

4K 的反向扩增引物：3'...ACGAGGCACATAAGTGAGCAACCTTCGAACGATCGCCGGCGAGCTCCG...5'
与目的基因结合序列 20bp 同源序列

5.2. 克隆载体的线性化

将 1 μ g 环状 PNPM5 质粒加入到 70 μ l 的酶切反应体系中，37℃消化过夜，内切酶使用量为 EcoR I 和 Hind III 各加入 1 μ l，酶切完成后置于 65℃加热 20min，失活内切酶，并进行纯化回收。

5.3. 目的基因的扩增

使用高保真酶，对目的基因进行扩增并胶回收。

5.4. 线性化克隆载体与目的片段连接

在冰盒上配制如下体系：

试剂	加量
ShinoRec®10×反应缓冲液	2
ShinoRec® 重组酶	1

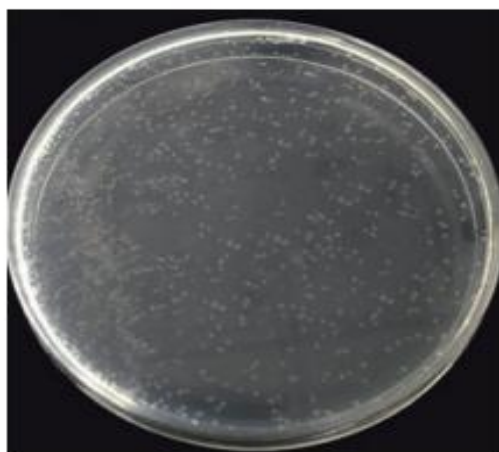


PNPM5 ($\approx 20\text{ng}/\mu\text{l}$)	4
4kb 插入片段 ($\approx 50\text{ng}/\mu\text{l}$)	4.5
ddH ₂ O	加至 20 μl

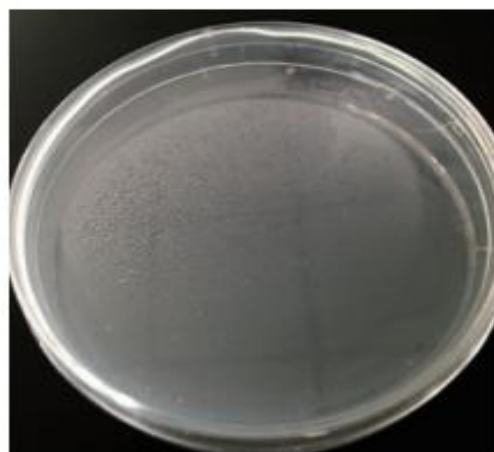
5.5. 使用移液器上下吹打轻轻混匀各组分，置于 37℃ 反应 20 分钟。反应完成后进行转化。

5.6. 反应产物转化，涂板

方法参见 4.5，生长结果参见下图一，阴性对照参见图二：



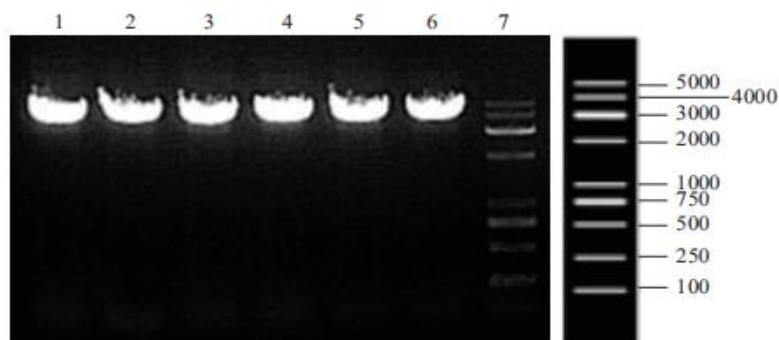
图一



图二

5.7. 克隆鉴定

过夜培养后阳性对照有克隆生长，而阴性对照无阳性生长，挑取图一平板上 6 个克隆进行菌落 PCR 鉴定，引物为 PNPM5-F/4K-R。鉴定结果需有 4kb 大小的条带出现，结果见图三：



图三

泳道 1-6: 菌落 PCR 鉴定结果，
大小为 4kb

泳道 7: DNA Ladder 2000 Plus



技术手册

1. 引物设计

1.1. 多片段引物设计方法 多片段项目在设计引物时，与载体相连的部分按照上面的方法设计即可，但是中间的片段在设计引物时，同样需要有 15-20bp 的同源序列。如图 1 所示：

1.2. 载体或目的片段末端上有多余非同源片段时如何设计引物？

载体（图 2）或目的片段末端非同源序列可以通过同源重组方法去除。

a. 随着末端非同源序列（不匹配碱基数）的增加，重组效率按指数水平下降。

b. 增加目的片段与载体同源序列的长度（如从 15bp 增加到 20bp），可以显著提高重组效率。

c. 目前，ShinoRec®PCR 一步定向克隆试剂盒（无缝克隆）能成功应用于载体和目的片段不超过 5-15bp 的末端非同源序列的重组克隆。

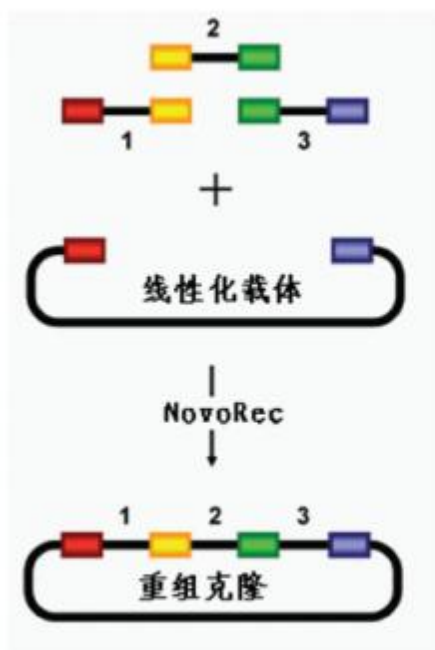


图1

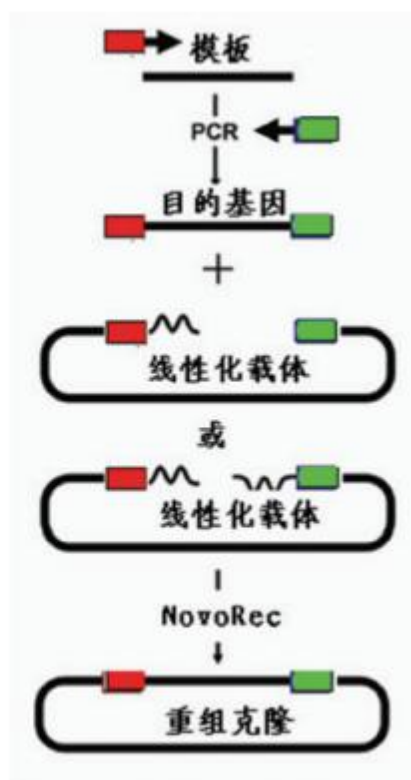


图2

~~: 表示非同源序列

图 1: 多片段连接示意图（颜色相同部分表示 15-20bp 同源序列）。

图 2: 载体末端有非同源序列的重组克隆（颜色相同部分表示 20bp 同源序列）。

2. 重组构建

2.1. 目的片段与载体摩尔比的计算

目的片段与载体的摩尔比在 3:1-10:1 之间，如果摩尔比低于 3:1, 转化效率会下降。摩尔比可登录 www.ShineGene.com.cn 在线计算，也可根据以下公式计算：



$$\text{目的片段 / 载体} = \frac{\text{载体的大小 (bp)} \times \text{目的片段的质量 (ng)}}{\text{载体的质量 (ng)} \times \text{目的片段的大小 (bp)}}$$

如果是多片段相连接，依然按照上面的公式计算，只是片段与片段的摩尔比为 1:1，这样 保证所有片段与载体的摩尔比是一致的。

2.2. 线性化载体的浓度

一般的，回收后线性化载体浓度需要>15ng/ μ l，对大片段载体更需提高浓度以保证重组效率。

2.3. 使用 ShinoRec 重组酶，效率怎么样？

下面的表格是用不同大小片段，以 pUC19 作为载体，进行蓝白斑筛选的结果。感受态的转化效率为 $3.0 \times 10^6 \text{CFU}/\mu\text{g}$ 。CFU 是指 colony-forming unit，菌落形成单位。平均转化效率(CFU/ng)是指每 ng 载体对应板上长出的克隆数。

片段大小 (bp)	白斑数 (CFU)	涂板载体量 (ng)	平均转化效率(CFU/ng)
500	2083	7	298
1000	2734	7	391
1500	1881	7	269
2000	1043	7	150
2500	655	7	94
3000	533	7	77
3500	374	7	54
4000	241	7	34

所以本试剂盒完全能满足在一般的感受态效率下的大多数的克隆反应。

2.4. 如果载体过大，怎么处理？

- 1) 载体过大（大于 8K），需要增加反应中载体总量，建议一次反应至少加入 100ng 载体。
- 2) 选用效率高的感受态细胞。

2.5. 插入片段过大要如何处理？

几乎所有的连接反应都有这样的现象产生，即随着目的片段长度的增加，连接效率会下降，而在使用 ShinoRec®

PCR 一步定向克隆试剂盒时，可以通过以下方法来提高重组效率：

- 1) 在设计引物时，将与载体同源的序列由常规的 15-20bp 大小增加至 20-30bp；
- 2) 提高目的片段与载体的摩尔比，比如将摩尔比增加至 5:1 或者更高；
- 3) 适当延长反应时间；
- 4) 第一次转化后可将剩余的反应液存放于 4 度，留待后面继续转化。

2.6. 单酶切（黏性末端，平末端）处理的载体片段，是否影响阳性率？

实验证明，单酶切或双酶切获得的线性化载体，无论是粘性末端还是平末端，他们在重组反应中的效率是一样的，需要提醒的是，载体酶切一定要完全，否则未切开的载体会影响后续的阳性克隆鉴定。

3. 常见困难分析

3.1. Taq DNA 聚合酶扩增后末端加 A 影响重组效率吗？

Add: Floor 2, Gate 6, 289#, Minqiang Road, Songjiang District, Shanghai 201612

Tel: +86-21-54460832

Fax: +86-21-54460831

Web: www.synthesigene.com

E-mail: master@shinegene.org.cn



目的片段用 Taq DNA 聚合酶扩增后是 3'端增加 A，不会影响重组效率。

3.2. 同源序列不完全匹配会不会影响重组效率？

同源序列不完全匹配，则会影响重组效率的。所以除非是特殊原因，否则在设计时，同源序列最好是相匹配的。

3.3. 转化不长，是什么原因？

转化的平板无克隆生长，如果阳性对照也无克隆生长，可能原因是：

- 1) 平板的抗性弄错了，或者平板存放的时间太长了，建议重新转化，并重新倒抗性正确的平板；
- 2) 感受态效率低，建议使用效率高的感受态；
- 3) Kit 保存不当，酶失活了，建议使用新的 Kit；

转化的平板不长，但是阳性对照长了，可能是目的片段或者载体出问题了（降解、浓度低），需要重新制备线性化载体或目的片段。

3.4. 转化后克隆在板上长得很好，就是没有阳性，是什么原因？

- 1) 载体没有处理好，可能是因为载体在做酶切时，体系中加入的载体量太多，或酶切时间太短，导致载体未完全线性化，建议重新处理好载体；
- 2) LB 平板存放时间太长了，抗性减少或消失，建议重新配制新鲜的 LB 平板；
- 3) 确定阳性鉴定的方法（引物、PCR 条件）是否有问题，是否会漏检出阳性克隆。

3.5. 鉴定有阳性，但是测序不是目的基因，为什么？

- 1) 引物特异性不强，扩增到的不是目的基因，建议重新设计引物扩增；
- 2) 模板上没有自己的目的基因，建议将模板测序，确定模板是正确的；
- 3) 目的基因 PCR 扩增后割胶回收，确保大小正确。

3.6. 阳性克隆测序后发现在序列的引物处有碱基突变，是什么原因引起的？

目前我们实验只要同源序列匹配，用 ShinoRec®一步定向克隆试剂盒做的重组反应，接头处没有出现过错配的现象，所以引物处有碱基突变主要原因有

2 个：

- 1) 引物合成有错误，建议采用高纯度的引物；
- 2) 扩增时用的聚合酶保真度不高导致碱基有突变。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市松江区新桥镇民强路 289 号 6 号门 2 楼

邮编：201612

联系：市场部

电话：021-54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

