

# 无缝克隆解决方案

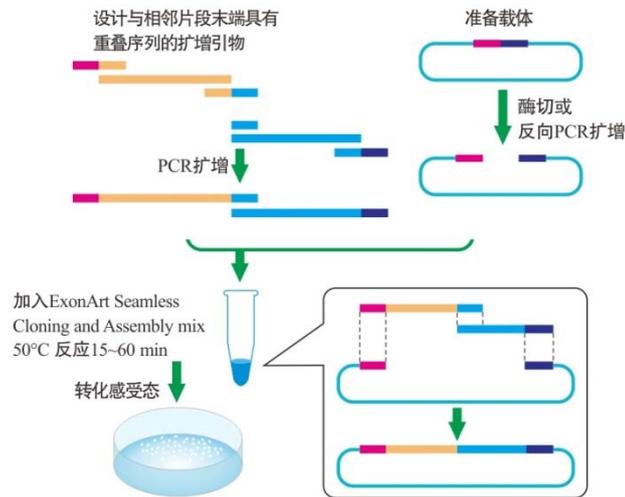
## 1. 无缝克隆

基于重组原理的无缝克隆技术，作为新一代的克隆方法，不依赖繁琐的酶切、连接步骤，也不需要末端补平操作，通过 DNA 片段与线性化载体末端 15~25 nt 同源序列的重组，可将 DNA 片段克隆至任意线性载体的任意位点，载体自连背景极低，是一种简单、快速、高效的 DNA 定向克隆技术。

原理如下：

无缝克隆通过 T5 核酸外切酶沿 5'→3'方向降解 dsDNA，产生黏性末端，但 T5 外切酶并不能保证切割出 5'端都一样长的粘性末端。在退火之后，无缝克隆中的 DNA 聚合酶会针对缺失的碱基进行添加，Taq 连接酶催化碱基之间形成磷酸二酯键，将所有缺口补齐。

具体实验流程如下：



## 2. 无缝克隆与传统酶切克隆的比较

相比传统的酶切克隆，无缝克隆更便捷更灵活，不受酶切位点限制，可以在质粒的任何位点进行一个或多个 DNA 片段的插入。

无缝克隆	传统酶切克隆
不受片段、载体序列酶切位点的限制，可任意组装	受限制性内切酶的限制
可同时无缝地拼接单一或多个片段，基因突变	单一片段的插入与连接
操作简便，时间上大大节省（30 min）	耗时较长（1day）
重组阳性率高	连接效率低

## 3. 设计引物需要考虑的因素

引物是决定 PCR 反应和克隆反应成败的最重要因素之一。在基因克隆的引物设计及 DNA 片段的扩增阶段，与常规 PCR 相同。差异在于载体末端和引物末端应具有 15~25nt 同源序列，由此得到的 PCR 产物两端分别带上 15~25 个与载体序列同源性的碱基。

- 特异性是由错配的频率决定。特异性差的引物易产生不需要的扩增产物。
- 扩增效率是指引物以每循环增加两倍扩增产物的最优能力。
- 重组效率指成功获得含有插入片段的克隆概率。

无缝克隆引物	原则
5' 端同源序列	5' 需要添加载体上/下游载体末端同源序列，同源序列长度 15~25 nt，且该区域内 GC 含量为 40%~50% 时，重组效率最高
长度	除同源序列 15~25 nt 外，目的 DNA 片段扩增的引物序列最佳长度为 24 或 25 个碱基左右，GC 含量含量为 40% -60% 为宜。
3' 端	<p>如果引物过短，在 3' 端具有四个 G 和/或 C 碱基可能会有帮助，尤其是用于扩增样品中的所有 cDNA 或 gDNA 的通用引物，但添加这些碱基可能增加基因特异性引物的非特异性扩增。</p> <p>特别注意引物不能互补，尤其是在 3' 末端，防止一对引物内的同源性。</p> <p>自身互补性（如，在上游引物内）可导致发夹结构的形成，发夹结构可在茎部有四个 G/C 碱基对和环内有三个碱基时形成。</p> <p>注意：PCR 的产量通常取决于 PCR 引物的 3' 端。引物间形成二聚体会降低扩增效率。</p>
3' 端序列特异性	<p>引物应该对要扩增的目的基因有特异性。</p> <p>BLAST 搜索可以用来寻找同源性区域。</p>
重复碱基	引物中二核苷酸重复的最大次数为 4 次(如 ATATATAT)。
Runs	避免长的单个碱基（大于 3 个）重复序列，否则可能造成移码或错配。

#### 单插入片段引物设计公式：

5'-上游载体末端同源序列+酶切位点（可删除）+目的基因特异性正向配对序列-3'

5'-下游载体末端同源序列+酶切位点（可删除）+目的基因特异性反向配对序列-3'

#### 多插入片段引物设计公式：

5'-上游载体末端同源序列+酶切位点（可删除）+目的基因特异性正向配对序列-3'

5'-前一片段末端同源序列+后一片段目的基因特异性正向配对序列-3' 或 5'-后一片段同源序列+

前一片段特异性反向配对序列-3'

5'-下游载体末端同源序列+酶切位点（可删除）+目的基因特异性反向配对序列-3'

#### 4. 载体与插入片段的获取方式

##### 线性化载体:

- 选择合适酶切位点，进行单酶切或双酶切处理，胶回收获取线性化载体；
- 在载体上设计反向 PCR 扩增引物，对载体进行反向扩增，胶回收获取线性化载体。

注:

酶切位点建议选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域进行克隆，当酶切位点 25 nt 区域内含量为 40~60% 时，重组效率最高。

载体酶切一定要完全，否则未切开的载体会影响后续阳性克隆的鉴定。

经双酶切进行线性化无需去磷酸化，经单酶切则建议去磷酸化，防止载体自连影响重组反应，导致克隆失败或阳性克隆率下降。

##### 插入片段:

- 设计特异性引物，以质粒、基因组 DNA 或 cDNA 进行 PCR 扩增目的基因，PCR 产物纯化回收或胶回收获取插入片段。

注:

推荐使用高保真的聚合酶进行扩增，以减少扩增突变的引入。

若 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定为特异性扩增产物，可直接使用，但加样体积应不超过总反应体积的 20%。

#### 5. 克隆失败或阳性率低的优化

- 引物设计不正确：具体设计参见引物设计原则，重新设计引物。
- 载体线性化：载体线性化不完全可直接影响重组反应，建议增加限制性内切酶用量，延长酶切时间，使用胶回收纯化酶切产物。重组反应载体加入量过少，引起克隆失败，建议增加反应中线性化载体量。制备的载体中含有重组反应抑制物，抑制反应，建议线性化载体进行胶回收纯化，纯化产物用 ddH<sub>2</sub>O 洗脱。
- 插入片段：以质粒、基因组 DNA 或 cDNA 为模板进行扩增时，使用高保真的聚合酶进行扩增，以减少扩增突变的引入。以质粒为模板进行 PCR 扩增时，可以使用已经线性化的质粒作为模板。对 PCR 产物进行胶回收纯化，防止杂质粒污染及非特异性产物的不正确插入。建议插入片段回收用 ddH<sub>2</sub>O 洗脱。

- DNA 片段比例不佳：载体与插入片段的加入比例影响重组反应，建议按照试剂说明书推荐的最适用量和比例配制反应体系。
- 感受态效率：感受态细胞转化效率应大于  $10^8$ cfu/ $\mu$ g，且加入重组产物的量需要小于等于感受态细胞体积的十分之一。