

M5 Hiper Most Complicated Gene Amplication and Seamless Assembly Kit

超高难度基因扩增和无缝克隆试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Hiper Most Complicated Gene Amplication and Seamless Assembly Kit	10T	MF877-01
M5 Hiper Most Complicated Gene Amplication and Seamless Assembly Kit	4x10T	MF877-01

本产品包含：扩增模块和无缝克隆模块，必须同时使用才能极大提高克隆效率，解决高难度基因构建难题。

【储存条件】 长期保存，请置于-20°C，有效期6个月。使用后请及时放入-20°C保存以保证酶的活性。

【产品组份】

	10T	4x10T
A、“扩增模块”组份		
M5 Hiper Most Complicated High-Fidelity DNA Polymerase (1U/μl)	25μl	100 μl
2× Most Complicated PCR Buffer	1.3 ml	3×1.7 ml
2mM dNTPs	0.5ml	2×1.0 ml
B、“无缝克隆模块”组份		
M5 Hiper Most Complicated Seamless Assembly and Cloning mix (5x)	20μl	80μl

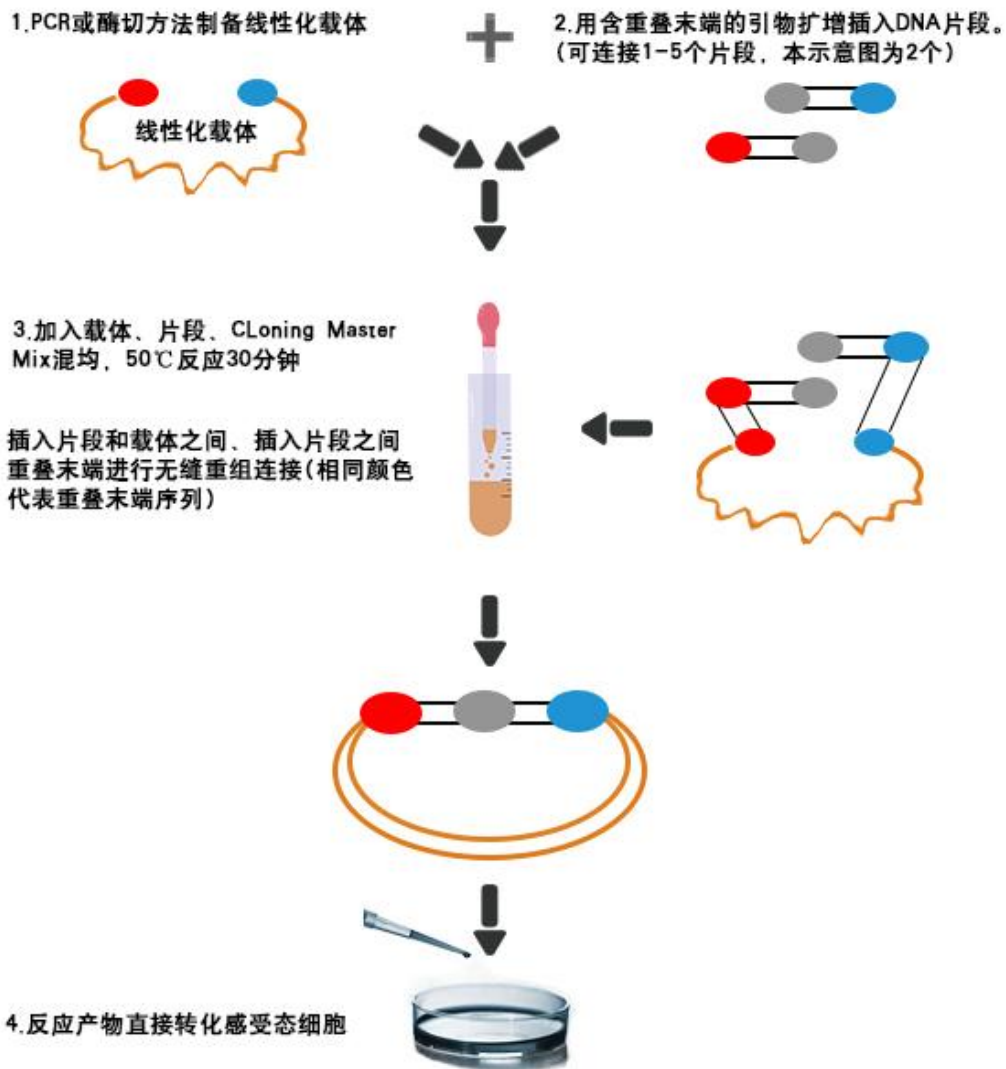
【“扩增模块”产品简介】

聚合美 M5 Hiper Most Complicated 超保真 DNA 聚合酶在 Magic 超保真酶系列技术基础上，应用了聚合美特制的<延伸增强剂>，抑制<PCR 停滞现象>，不仅保持了 Magic 超保真酶的高保真性，更明显提高了对高难度样品模板的扩增效率。M5 Hiper Most Complicated 超保真酶具有 5' 到 3' DNA 聚合酶活性和 3' 到 5' 的外切酶活性(即校读活性)，能够纠正 DNA 扩增过程中产生的碱基错配现象，在标准缓冲液中其保真度约相当于普通 Taq DNA Polymerase 的 50 倍、Pfu DNA Polymerase 的 6 倍。同时该酶还具有快速的 DNA 合成速度，约相当于普通 Taq DNA Polymerase 的 4-6 倍、Pfu DNA Polymerase 的 8-12 倍。该酶合成能力很强，即使是复杂的模板，也能快速准确的完成反应，尤其适用于对保真性要求高的 DNA 长片段的快速扩增，如基因克隆、测序、定点突变、SNP 分析等，也可用于 DNA 片段的末端补平。使用聚合美 M5 Hiper Most Complicated 超保真 DNA 聚合酶扩增得到的 PCR 产物无 3' 端突出碱基，不可直接用于 TA 克隆，可以用聚合美特制的平末端 TOPO 克隆（货号 MF021 和 MF022）。

【“无缝克隆模块”产品简介】

无缝克隆模块是不依赖于 T4 DNA 连接酶，不受载体和目的片段的酶切位点限制，而直接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与其两端具有 15-25bp 重叠区域的 PCR 片段定向重组，可以快速实现 1-5 个片段的高效无缝克隆。

【“无缝克隆模块”原理示意】



【“无缝克隆模块”引物设计】

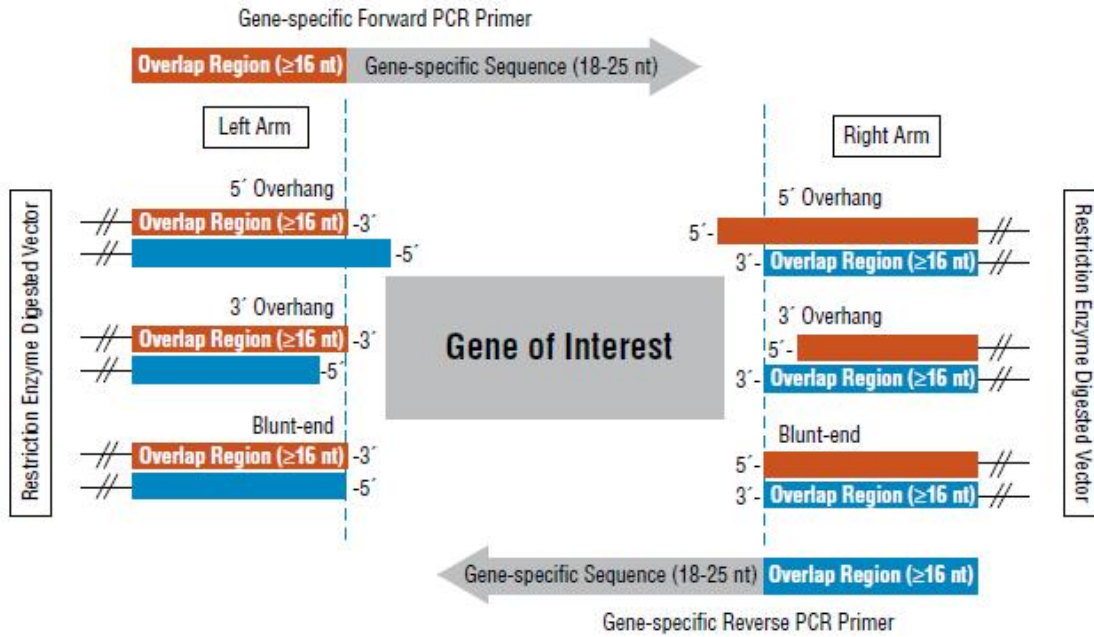
<线性化载体和插入 DNA 片段的制备>:

A、线性化载体的制备

- 1). 酶切来源: 酶切所得线性载体, 平末端或者粘端、单酶切或者双酶切均可, 酶切后胶回收。
注意: 一步法无缝克隆反应体系内无 DNA 连接酶, 不会发生载体自连反应。因此, 即使是以单酶切方式制备的线性化载体也无需进行末端脱磷酸处理。重组产物转化后出现的假阳性克隆(无插入片段)是由酶切不完全未线性化环状载体转化而形成的。我们推荐酶切后胶回收可以把这种未线性化载体比例降低到最低程度。
- 2). PCR 来源: 本试剂盒特制的扩增模块来制备, 如果扩增条带单一可以通过 PCR 产物纯化或者胶回收(货号: MF029)获得载体。
注意: PCR 的质粒模板也是非线性化载体, 也可能导致假阳性克隆(无插入片段), 因此 PCR 来源线性载体(PCR 产物)纯化前用 Dpn I 内切酶消化质粒模板, 可以降低背景, 提高阳性率。但是一般情况下, 经过胶回收已经足以把这种未线性化载体比例降低到最低, 因此反向 PCR 来源的线性化载体我们也推荐胶回收。

B、插入 DNA 片段的制备

- 1). 插入片段引物设计: 克隆引物包括插入片段特异性引物序列和重叠序列。
克隆正向引物(5'-3'): 线性载体正向 ≥ 16 nt 重叠区序列(3'末端算起)+插入片段正向特异引物序列(18-25 nt)
克隆反向引物(5'-3'): 线性载体反向 ≥ 16 nt 重叠区序列(3'末端算起)+插入片段反向特异引物序列(18-25 nt)
注意: 重叠区的碱基数至少 16 bp, 并且 Tm 值要 $> 48^{\circ}\text{C}$ (AT pair = 2°C and GC pair = 4°C), 否则可延长碱基数目直到符合要求。按照线性载体末端的结构(5'突出, 3'突出, 平末端), 引物设计也分 3 种情况, 示意如下:



线性化载体的两端因线性方式（如单酶切、双酶切、反向 PCR）不同，可以是以上三种末端结构的两两任意组合，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。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 Tm 值，载体末端同源序列不应参与计算。

正向引物设计举例说明（EcoRI 酶切开）：



如上图，载体由 EcoRI 酶切开，形成 5' 突出末端：

根据上述设计原则，从 3' 端开始计算，往回算 16bp-20bp（本举例采用了 16bp 末端重叠相同序列），加到目的片段特异引物序列前面即可。正向引物具体如下：5'- GCT AGC GAA TTG GCC G NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

注意：以上引物设计完成克隆连接后，EcoRI 酶切位点将会消失（不保留酶切位点）。

如果需要保留 EcoRI 酶切位点，需要在载体末端 16bp 重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐缺失的 EcoRI 识别位点序列 aattc，完成克隆连接后，EcoRI 酶切位点依然存在（保留酶切位点）。

具体如下：5'- GCT AGC GAA TTG GCC G aattc NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -3'

反向引物设计举例说明（HindIII 酶切开）：



如上图，载体由 HindIII 酶切开，形成 5' 突出末端：

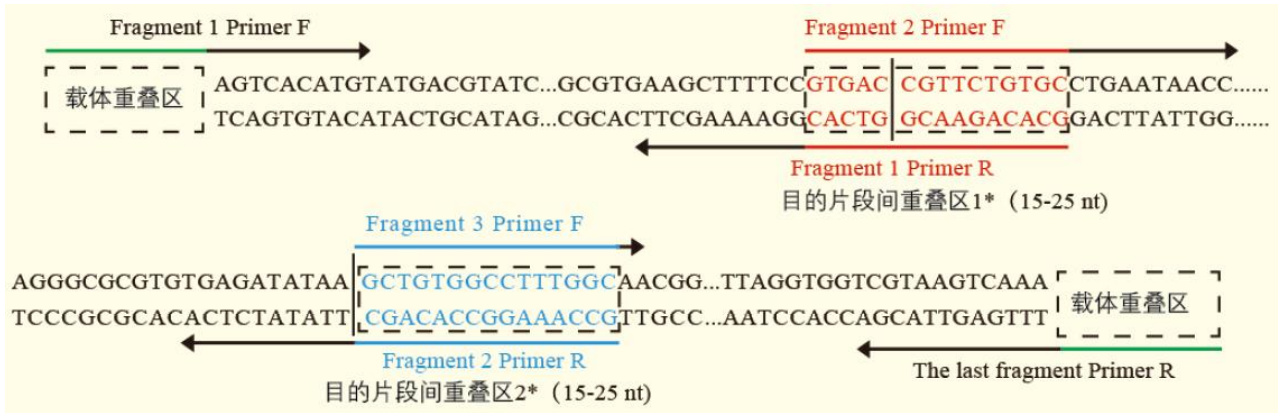
根据上述设计原则，从 3' 端开始计算，往回算 16bp-20bp（本举例采用了 16bp 末端重叠相同序列），加到目的片段特异引物序列前面即可。反向引物具体如下：5'- CAT CGG ATC GTT CGC A NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

注意：以上引物设计完成克隆连接后，HindIII 酶切位点将会消失（不保留酶切位点）。

如果需要保留 HindIII 酶切位点，需要在载体末端 16bp 重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐缺失的 HindIII 识别位点序列 agctt，Hind III 酶切位点依然存在（保留酶切位点）。

具体如下：5'- CAT CGG ATC GTT CGC A agctt NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

2). 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例：



* 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者两种方式混用均可，保证片段与片段之间有 15-25bp 的重叠区。

3). 酶的选择：建议使用高保真 DNA 聚合酶（货号 MF748 和 M272）或者 mix（MF743 和 MF292）。

4). 反应条件：一般按照具体使用的高保真聚合酶说明书进行即可。

5). 纯化插入片段（视如下几种情况选择回收方法）：

- 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。
- 片段来自 PCR 产物，且 PCR 结果单一，则建议用 PCR 产物纯化试剂盒（货号：MF029）纯化片段。
- PCR 有非特异扩增，则建议切胶回收，用胶回收试剂盒（货号：MF029）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（见前述正反向引物设计举例说明）。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。

【操作步骤】

一、片段扩增

1. 按下表配制 PCR 反应体系：

2x Most Complicated PCR Buffer	12.5 μ l
2mM dNTPs	2.5 μ l
Primer 1 (10 μ M)	0.5 μ l
Primer 2 (10 μ M)	0.5 μ l
Template DNA*	10-200ng
M5 Hiper Most Complicated High-Fidelity DNA Polymerase (1U/ μ l)	0.5 μ l
ddH ₂ O 补足至	25 μ l

建议的 PCR 条件：

95°C	5 min.
32-36 cycles of:	
95°C	25 sec.
53-64°C	20-25 sec.
68°C	15-30sec./1 kb
68°C	5 min.
保持 4°C forever	

<*模板量：10~200 ng 基因组 DNA，10~30 ng 质粒，或 1~2 μ l RT-PCR 反应后的 cDNA。以上举例为常规 PCR 反应系统，仅供参考。实际反应条件因模板、引物等的结构不同而异，需根据模板、引物、目的片段的特点设定最佳反应条件，并根据比例放大或缩小反应体系>。

注意：设置退火温度时，M5 Hiper Most Complicated 超保真酶为 Tm+3，不是 Taq 酶的 Tm-5！

2. 切胶回收 PCR 产物，并通过电泳确定片段的浓度，以便用于后续无缝克隆步骤。

二、片段连接

注意：M5 Compact Seamless Assembly and Cloning mix (5x) 含有连接增强剂很粘稠，从冰箱拿出来温度低时更粘稠，可以放在手心化冻几分钟提高温度便可降低粘稠度（不影响质量），轻弹混匀，瞬间离心收集到管底。

1. 按照下表建立反应体系（可使用 PCR 管在室温操作）

Linear Vector (10-80ng)*	X μ l
Linear Insert**	Y μ l
M5 Hiper Most Complicated Seamless Assembly and Cloning mix (5x)	2 μ l
ddH ₂ O 补足至	10 μ l

注意：推荐用通过电泳对比条带亮度进行定量，仅靠 OD 值是不够的。

* 载体一般用 20-50 ng。

** 插入片段与载体的摩尔比在 2:1-3:1 之间最佳；如果插入片段小于 200bp，插入片段与载体的摩尔比用 5:1。

2. 轻轻混匀，在 **37°C** 反应 15-30 分钟（可在 PCR 仪器上进行），反应结束后，将 PCR 管置冰上，直接转化或者保存于 -20°C。较短片段例如 100bp-1kb 只需要 15 分钟便能获得足够转化子，较长片段的连接，可以延长反应时间到 60 分钟。
3. 取 5 μ l 反应产物按照感受态细胞说明书进行转化。重组产物加入的量不要超过感受态体积的 1/10，比如 5 μ l 反应物加入至少 50 μ l 感受态细胞中，如果转化子较少，可以将所有的产物转化并将所有的转化液涂板。

三、阳性克隆鉴定

可根据具体情况，选择菌落 PCR 鉴定（货号 MF002-plus），提取质粒（货号 MF031-plus）进行限制性内切酶鉴定或测序鉴定。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。