Biodragon

闪电克隆试剂盒

Lightening Cloning Kit

Components	BDIT0014-25	BDIT0014-50	BDIT0014-100
Lightening Cloning Master Mix（2×）	125μl（~25次）	250μl（~50次）	500 μl（~100次）

介绍

不同于普通分子克隆方法，闪电克隆试剂盒通过简单的体外一步（同源重组）实现DNA克隆。该方法极大简化了克隆过程，无论是单链DNA，还是大到几百kb的DNA片段，均可以高效完成克隆构建。只需将载体质粒线性化，再用PCR法将与载体质粒同源区（约15bp）导入插入片段（Inserts）两端，混合后加入重组酶，即完成质粒构建。该方法可以一步实现多个片段按顺序同时插入载体质粒中。

特点

1. 比传统克隆方法更简单，步骤更少，试剂需求也少，整个流程时间更短。
2. 可同时插入多个插入片段，无需寻找合适的酶切位点。
3. PCR产生的片段无需酶切，线性化载体可以通过酶切或PCR方法产生。
4. 重组产生的DNA接头处不引入任何多余碱基，有利于融合蛋白或核糖体结合位点RBS的构建。
5. 可用于将线性化DNA重新连接成环状，适合定点突变操作。
6. 只要是可以PCR的DNA片段，均可用该克隆试剂盒。
7. 插入n个DNA片段与一个片段所花费的时间是一样的。

保存

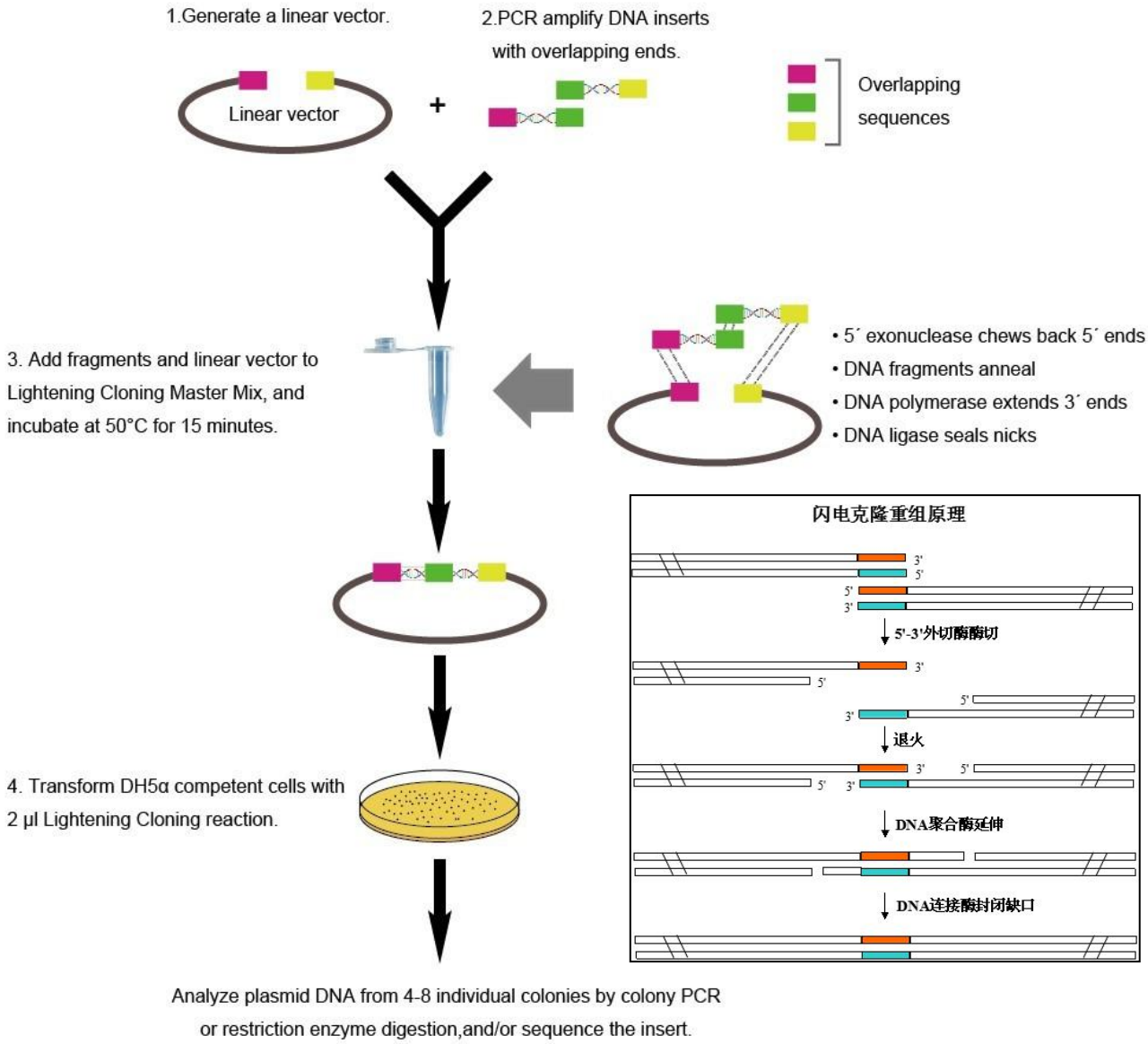
-20℃保存18个月（此温度下不会冻结，无需分装）；冰袋运输。

闪电克隆流程

1. 设计用于扩增插入片段（和/或载体质粒）的引物序列，引物上携带合适的重叠序列。
2. 用高保真聚合酶PCR扩增插入片段。（无需考虑产物末端有无A尾，重组过程中将被去除，在最终质粒中不会出现）
3. 用高保真酶PCR扩增（或酶切）将载体质粒线性化。
4. 测定插入片段和线性化载体的浓度。
5. 将插入片段和线性化载体加入Lightening Cloning Master Mix溶液中，50℃水浴15 min。
6. 转化DH5α等感受态细胞。

www.biodragon.cn
400-921-8278
sales@biodragon.cn
tech@biodragon.cn

图1: 闪电克隆流程示意图（以同时插入2个插入片段为例）



含重叠区（Overlap）的引物构建原则

闪电克隆所用PCR的引物包含以下两部分：

- 针对载体上插入位点两端的重叠区部分；
- 针对要扩增的插入片段部分；

重叠区序列放在引物的5′-端，与要插入位点的5’-末端序列一致。重叠区序列长度由其GC含量不同有所变化。建议重叠区长度为15-25 nt，Tm值等于或大于48℃。

插入片段序列放在引物的3’-端，紧随重叠区。遵从一般引物设计原则。

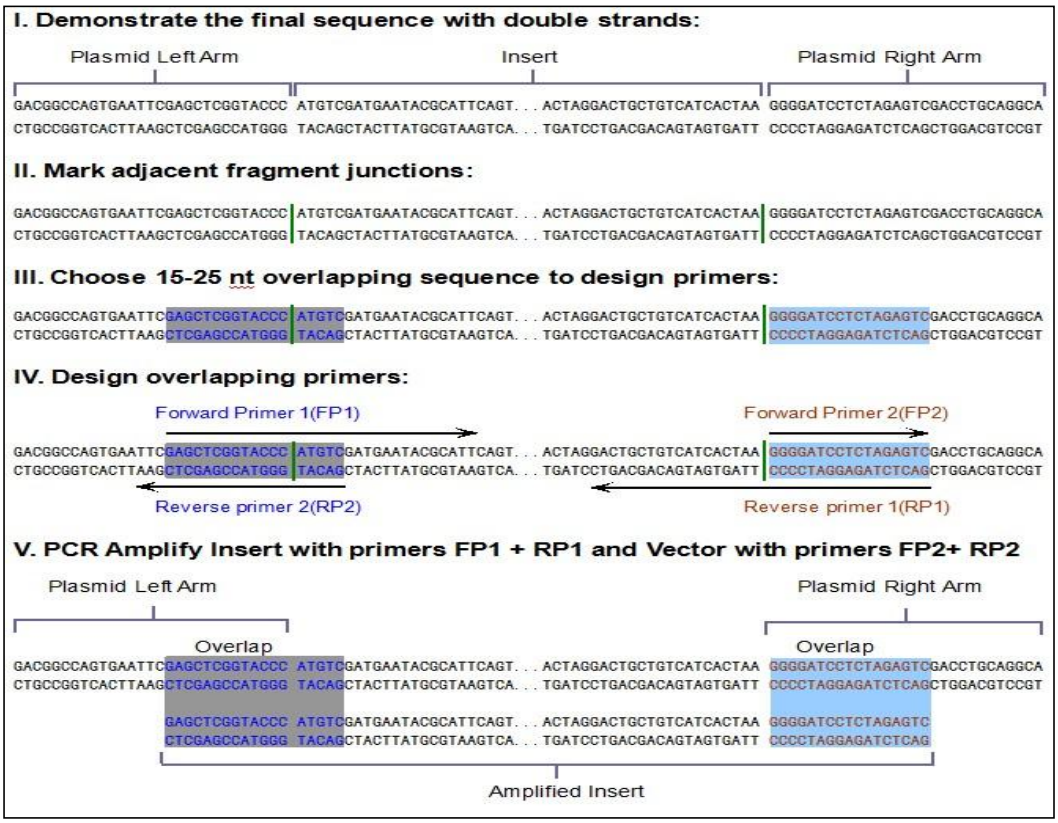
www.biodragon.cn
400-921-8278
sales@biodragon.cn
tech@biodragon.cn

方法一：PCR法线性化载体的引物设计

如果用PCR法来为某个插入片段而线性化载体，可以考虑将部分插入片段的序列放入载体的引物（见图2中IV的蓝色字母序列及RP2引物），这样可以减少引物长度；但如果要在该载体分别放入不同的插入片段，那么载体的引物只能全部针对载体序列，不能含有插入片段的序列（见图2中IV的黄色字母序列及FP2引物）。

PCR法线性化载体比方法二的酶切法背景更低，如果用较高浓度的载体质粒作为PCR模板，或发现克隆中背景较高时，建议用DpnI对PCR产物进行酶切处理（DpnI只切开来自E. Coli的甲基化的质粒DNA，对非甲基化的PCR产物无作用），如有必要，可以再进行电泳和回收，进一步降低背景。

图 2：PCR 法线性化载体的引物设计



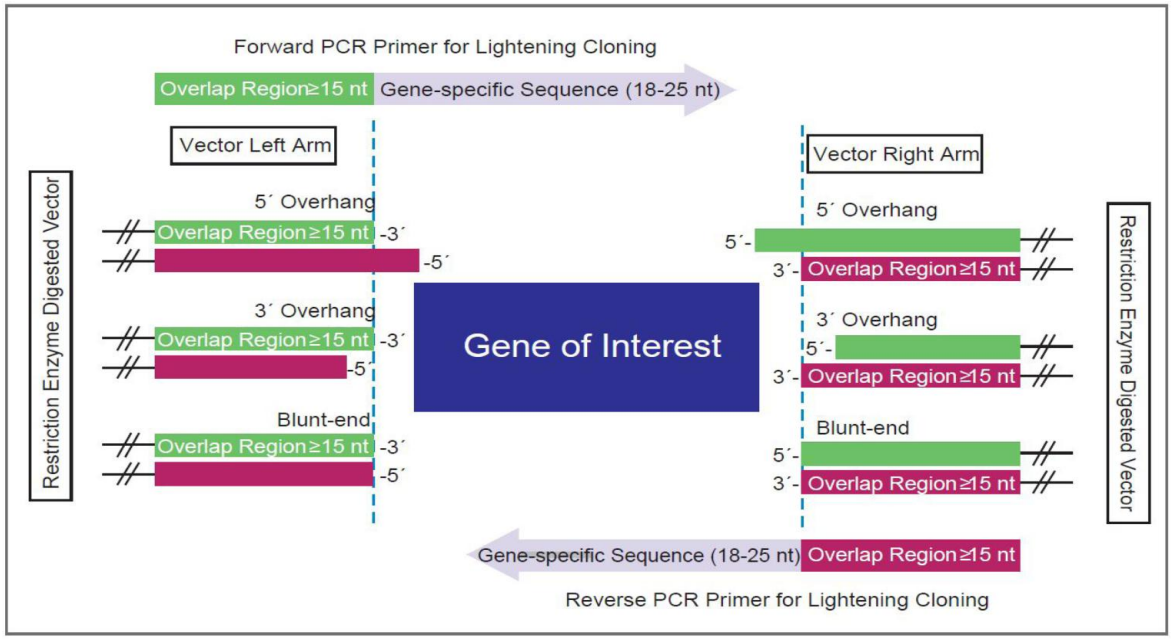
方法二：酶切法线性化载体的引物设计

载体也可以通过限制性内切酶方法实现线性化。（单酶切就可以，不会产生自连背景。但双酶切比单酶切更能降低因为载体酶切不彻底而产生的背景，建议尽量选择靠多克隆位点两端的酶切位点，避免残留的酶切位点的发卡结构干扰同源重组）

1. 有些限制性内切酶不能充分切开超螺旋DNA，为了减少背景，最好对酶切后的载体进行回收。
2. 限制性内切酶对不同质粒提取试剂盒提取的质粒可能存在酶切效率差异，这种情况下可以通过延长酶切时间或增大酶量以确保酶切完全。
3. 如果插入片段中含有与载体酶切相同的位点，就必须对酶切后的载体进行纯化，方法包括热灭活、或酚-氯仿抽提/酒精沉淀或琼脂糖凝胶电泳。

4. 避免用产生高G/C粘性末端（比如GGCC等）的内切酶位点，这类粘性末端会通过自连产生背景。
5. 载体质粒经过酶切后末端有3种可能：5’突出（5’ Overhang）、3’突出（3’ Overhang）和平末端（Blunt-end）。不管哪种末端，插入片段与其重组后，该酶切位点都会消失。当然，可以在引物的重叠区（Overlap Region）和插入片段区（Gene-specific Sequence）之间设计新的酶切位点。（见图3）

图 3: 酶切法线性化载体的引物设计



注意：上、下游引物里的重叠区一定要延伸到载体酶切后 3’末端的最后一个碱基

闪电克隆步骤

1. 按下表建立一个10μl闪电克隆反应体系（建议用无核酸酶的PCR管，并置于冰上操作）：

内容	体积
线性化载体	1-2 μl
插入片段 (1个或多个)	2-4 μl
Lightening Cloning Master Mix (2×)	5 μl
ddH_2O	to 10 μl

注1：“Lightening Cloning Master Mix (2×)”容易挂壁，使用前请低速离心，将所有液体集中到管底。

注2：通常最佳反应条件是50-100 ng线性化载体DNA，载体和片段的摩尔比为1:1至1:3。如果插入片段小于200bp，加大到5倍量。对于未纯化的PCR产物，其体积不要超过总体积的20%（建议对线性化载体和插入片段进行回收纯化）。插入片段越多或越长，克隆效率就越低。如果同时插入多个插入片段，建议按相同摩尔数加入。

2. 在50℃水浴锅内放置10-15分钟。完成后放置在冰上或-20℃保存至下一步转化试验。

www.biodragon.cn
400-921-8278
sales@biodragon.cn
tech@biodragon.cn

注：为了提高克隆效率，可以将反应时间延长到60分钟（但不要超过60分钟）。

3. 取2-4μl反应液转化DH5α等感受态细菌。

转化步骤

1. 冰上溶解100μl DH5α等感受态细菌。
2. 加入2μl冰预冷的闪电克隆反应液。用移液枪轻轻吹打，或手指轻拨管壁4次混匀。不用振荡。
3. 冰上静置30分钟。
4. 42℃水浴锅内热击45秒。
5. 冰上放置2分钟。
6. 往里面加入950μl平衡至室温的SOC/LB培养液（不含抗生素）。
7. 37℃摇床中振荡（250rpm）培养60分钟。
8. 将筛选平板放入37℃培养箱中预热。
9. 取100μl涂平板（含抗生素）。（建议使用适当稀释的质粒作为阳性对照，检测转化效率）
   （检测感受态效率方法：转化100pg的阳性对照质粒。一般感受态的转化效率在1-3×10^9 菌落/μg DNA）
10. 37℃培养箱培养过夜。

www.biodragon.cn
400-921-8278
sales@biodragon.cn
tech@biodragon.cn

常见问题

现象	原因	解决方法
阳性对照板未长菌落	感受态效率低	重新制备或购买效率更高的商品化感受态
	转化效率低	严格按步骤进行转化
	感受态操作不当	1. 感受态不能反复冻融，最好在冰上溶解，并马上进行转化试验 2. 感受态很脆弱，不能剧烈震荡，混匀时要轻柔。 3. 检测感受态效率 4. 感受态细菌要保持在-80℃冰箱
	平板抗生素不对	换上正确种类和浓度的抗生素。常用抗性为氨苄，浓度50μg/ml
闪电克隆板未长菌落	闪电克隆试剂盒失效	检查闪电克隆试剂盒保存方法是否正确，是否过期
	引物设计错误	检查引物设计是否正确
	重叠区设计不当	避免将重叠区设计在有重复序列区域，否则重组效率会降低10倍。如果要插入的位置是多克隆位点（MCS），强烈建议选择靠MCS两端的酶切位点，避免回文结构的干扰。如果必须使用位于MCS中间的酶切位点，转化时请加大反应液的量
	插入片段DNA和载体的量不正确	加大插入片段和载体的用量重新进行闪电克隆试验。建议反应前对插入片段DNA和载体进行纯化。注：建议尝试尽量加大载体和片段的用量，以增加重组几率
	插入片段的PCR产物量太少或太杂	通常PCR产物都是非常特异的一条带。如果发现PCR产物有很多条带，可能是PCR模板没有处理好，建议不要直接用基因组做模板，应先将目的片段装入T载体，测序正确后再作为模板
	克隆效率低	插入片段越大、或插入片段越多，克隆效率越低。尽量避免同时插入3个或以上片段（可以考虑分次插入）。注：可取少量闪电克隆反应液进行琼脂糖电泳，通过观察插入片段、载体以及重组带的亮度变化来判断闪电克隆效率
	转化效率低	分析插入片段是否对E. coli有毒性，如果是，可以考虑换低拷贝载体，比如BAC
得到大量菌落，但没有正确的插入片段	插入片段不正确	如果PCR产物不是单一条带，必须进行电泳和回收，避免混入其它非特异条带
	含插入片段的DNA转化效率低	分析插入片段是否对E. coli有毒性，如果是，可以考虑换低拷贝载体，比如BAC
	载体未完全线性化	确保载体酶切完全，否则重新酶切和跑胶纯化。另外，避免用会产生高G/C粘性末端（比如GGCC等）的内切酶位点，这类粘性末端会通过自连产生背景
	PCR产物中混有的质粒模板	先用DpnI酶切PCR产物，再进行电泳回收

温馨提示：如果您是首次使用闪电克隆试剂盒，建议您在实验前与我们的技术支持取得联系（联系方法见本说明书页脚），他

www.biodragon.cn
400-921-8278
sales@biodragon.cn
tech@biodragon.cn

们会让您快速理解和掌握本试剂盒的使用方法，避免不必要的失误。

www.biodragon.cn
400-921-8278
sales@biodragon.cn
tech@biodragon.cn