

Seaming Cloning Kit

无缝克隆试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL625A	无缝克隆试剂盒	10T
BL625B	无缝克隆试剂盒	50T

产品简介:

该产品是利用同源重组以及大肠杆菌的自我修复功能设计一款无需酶切连接、高效、快速、价格优惠的体外重组试剂盒。

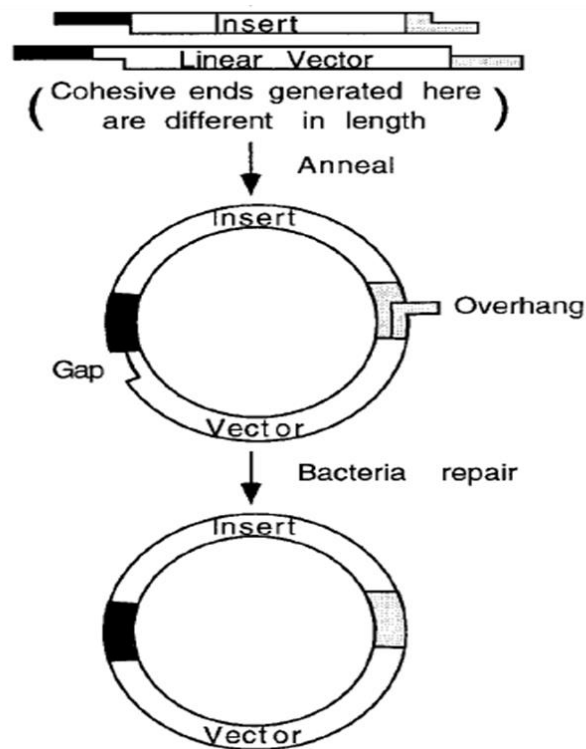


图 1. 核心原理：同源重组及大肠杆菌自我修复

产品特点:

1. 操作简单，节省时间。
2. 不需要考虑载体及序列的酶切位点问题，可将目的序列任意插入载体的任意位置。
3. 可同时连接多个片段（3-5）。
4. 包装人性化，方便操作，保证酶活。
5. 保证实验质量的同时大大降低实验成本。

产品组成:

组分	10T	50T
5×Seamless Cloning Mix	50 μ l	250ul
Buffer	200 μ l	1ml

使用方法:

1、线性载体准备

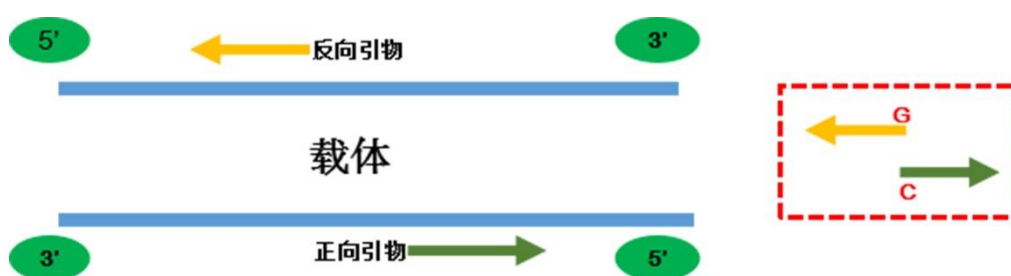


图 2. 线性化载体示意图。（红色虚线框表示两条引物末端不要 GC 配对）

1. 选取载体上下游任意想要插入的位点设计正反向引物，建议引物 T_m 值相近（如图 2），两条载体末端尽量不要选择 GC 互补会增加假阳性的概率；
2. PCR 得到线性载体，（建议高保真的 PCR 酶，50 uL 体系）；
3. 胶回收，适当可以延长跑胶时间去除 PCR 体系中的模板质粒，测浓度待用。

注：以下步骤 2 选 1 可大大降低假阳性：1. 以步骤 3）中 PCR 回收线性载体为模板再次进行 PCR，产物回收，测浓度，作为最终的线性载体；2. 将步骤 3）回收后的线性载体用 DPN1 消化 30 min 除掉 PCR 体系中加入的质粒模板，1 uL DPN1 可消化 1-2 ug 质粒）

最终得到的线性载体保存在 -20°C 可以反复使用，并且可以作为模板 PCR 得到新的线性载体。

2、插入片段准备

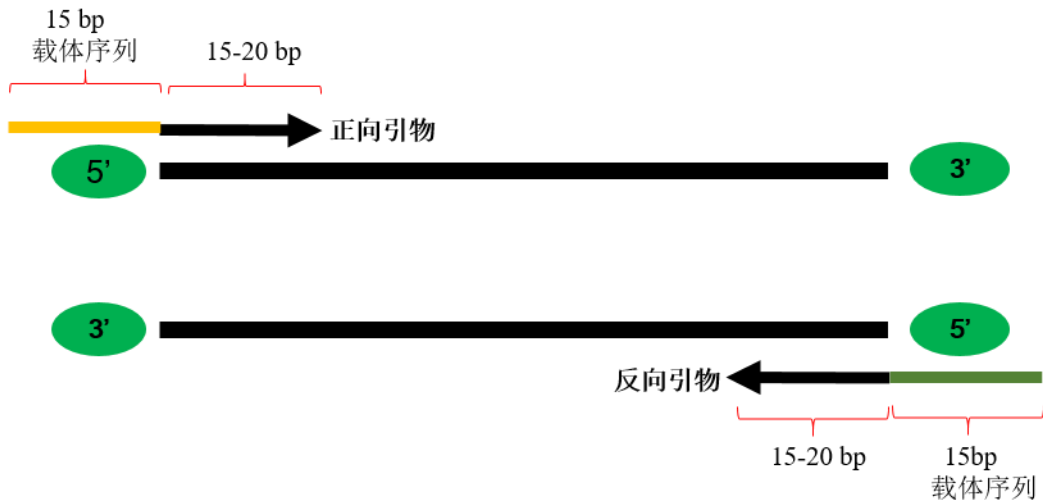


图 3. 插入片段引物设计示意图。

1. 如图(2 和 3)正反向引物包括目的序列及载体上的序列各 15 bp;
2. PCR 得到线性载体, (建议高保真的 PCR 酶, 50 uL 体系);
3. 胶回收, 测浓度待用。

3、连接步骤

1. 计算连接体系:

组分	体积
线性载体	X uL
插入片段	Y uL
5×Seaming Cloning Mix	4 uL
Buffer	Z uL
Total	20 uL

计算方法: a. 体系中线性载体的量 50-100 ng, 根据步骤三中线性载体的浓度计算出体系中载体的体积 X;

b. 体系中 n 线性载体: n 插入片段 = 1:2~3 (摩尔比), 根据该比例和插入片段的浓度计算出体系中插入片段的体积 Y;

c. 补加溶液 Buffer 至 20 uL

2. 在 PCR 管中按比例加入上述体系 (尽量置于冰上)。
3. 30°C, 反应 35-40 min (水浴或 PCR 仪中均可)。
4. 取出 DH5a 菌株 (50-100 uL)冰上溶解 (感受态效率会对结果有一定影响)。

5. 将连接后的反应体系加入 DH5a 中，轻轻混匀。
6. 冰上放置 25 min。
7. 42℃ 水浴热激 45s，取出冰上放置 2-3 min。
8. 加入 800 uL LB 或 SOC 培养基，37℃、180 rpm 孵育 40-50 min。
9. 涂平板。
10. 挑取单菌落送测序（可选步骤：菌落 PCR 或提质粒通过琼脂糖凝胶电泳验证插入片段是否连接成功）。注：根据实验情况决定送测序样品个数。

注意事项：

- 1、对于多个片段的重组反应，重组效率通常会低于单个片段的重组效率，建议胶回收纯化后再进行重组反应。对于 3 个以上片段的重组反应或重组片段大于 5kb 时，强烈建议在胶回收后再进行重组反应。通常胶回收后，重组效率可提高 2-10 倍
- 2、载体和片段的比例推荐 1：2~3，可根据具体条件进行适当的调整，但比例不应低于 1：1。
- 3、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

保存方法：

避免反复冻融，-20℃ 保存 1 年。