

无缝克隆试剂盒

包装量:

目录编号	包装单位
171201	10 次

Components	171201
2 × Cloning Mix	25μl × 2

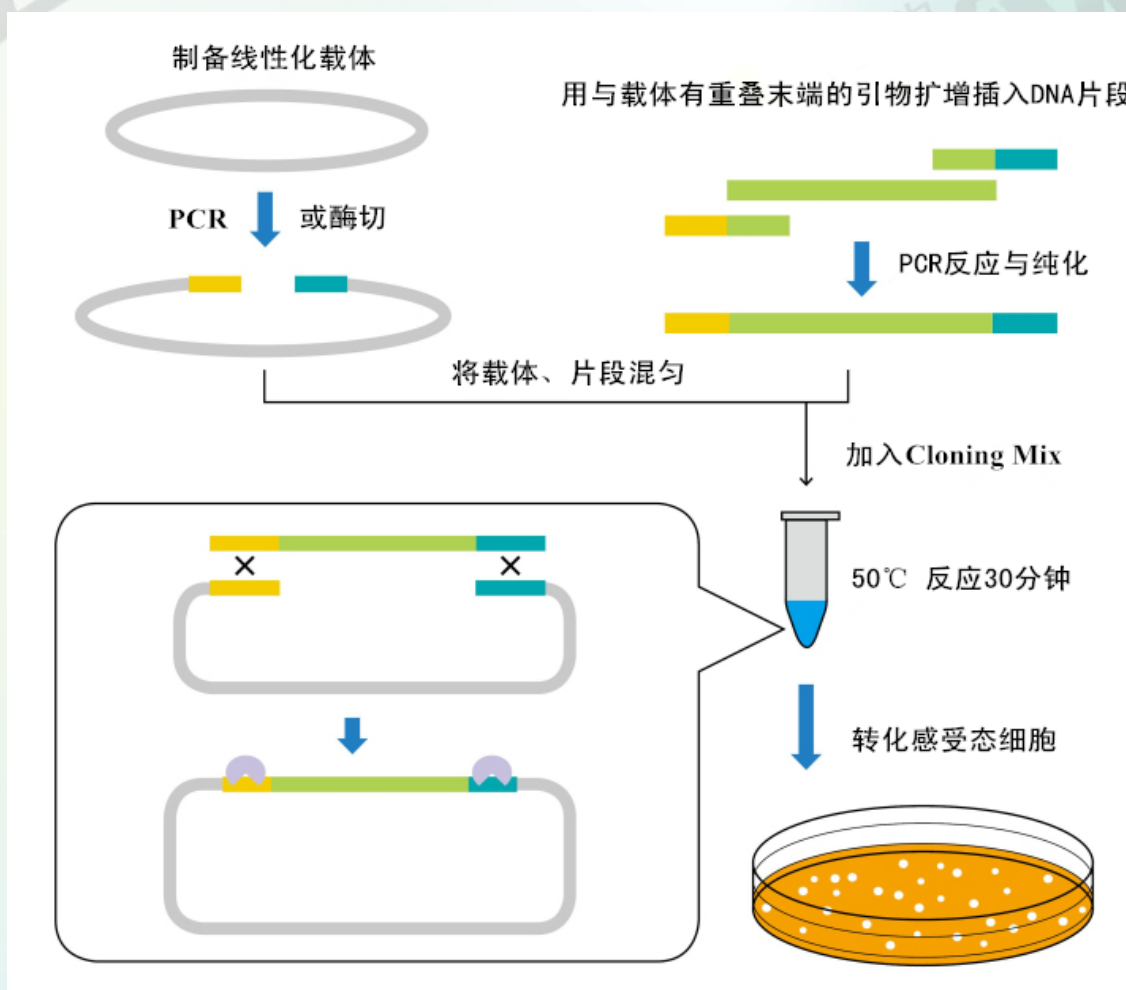
产品储存: -20℃ 保存，避免反复冻融

制品说明: 本制品不依赖于 T4 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，采用特殊的重组酶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。

产品特点:

1. 30分钟可以将一个或者多个长、短PCR扩增片段（平端、A端均可）插入载体。
2. 不受载体和插入片段酶切位点的可用性和平端/粘性末端的限制，可以在任意位点进行克隆。
3. 无缝克隆，插入点不会引入不需要的碱基序列。
4. 高效、准确，阳性率>95%。

原理示意图:



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。

(2). PCR来源: 建议使用 *pfu* 系列高保真DNA聚合酶制备, 如果扩增条带单一可以通过PCR产物纯化 (货号: 130202) 获得载体, 否则通过胶回收 (货号: 130102) 获得载体。

可选: PCR来源线性载体纯化前用Dpn I内切酶消化质粒模板, 可以降低背景, 提高阳性率。

B: 插入DNA片段的制备

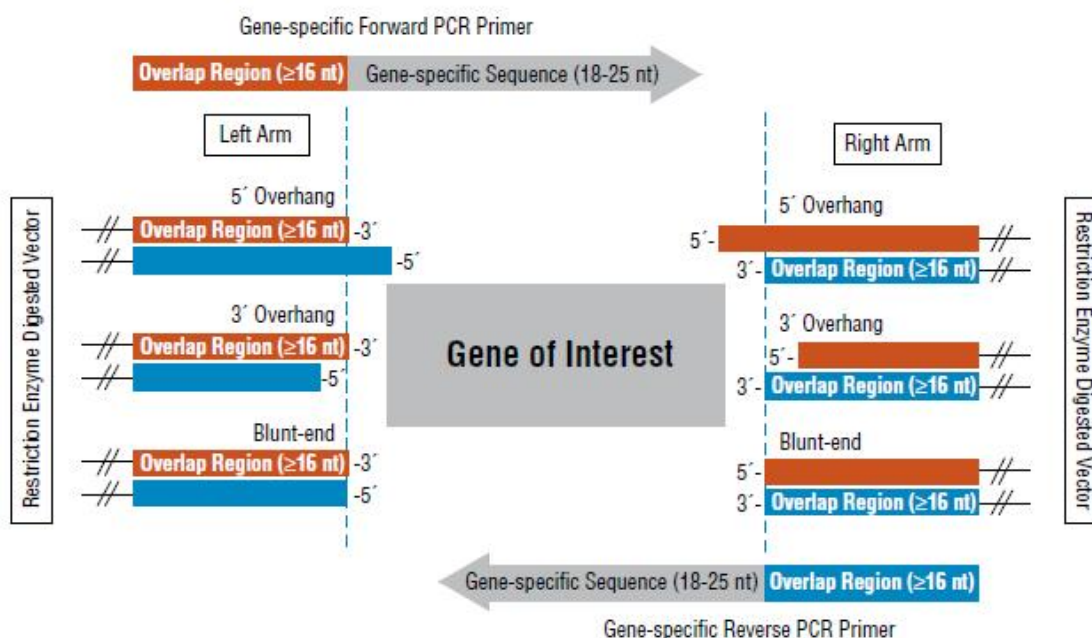
(1). 单个插入片段克隆引物设计: 克隆引物包括插入片段特异性引物序列和重叠序列。

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)

克隆正向引物 (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)

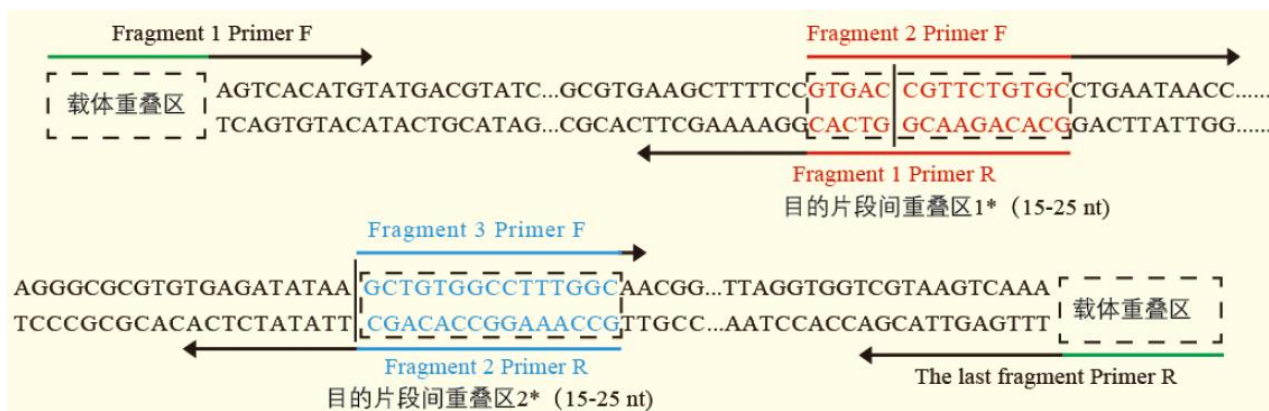
注意: 重叠区的碱基数至少16 bp, 并且Tm值需要 $> 48^\circ\text{C}$ (AT pair = 2°C and GC pair = 4°C), 否则可延长碱基数目直到符合要求。

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。

(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。

- (3). 酶的选择：建议使用 pfu 系列高保真DNA聚合酶。
- (4). 反应条件：一般按照具体使用的聚合酶说明书进行即可。
- (5). 纯化插入片段

- **可选：**如果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。
- 如果片段单一，则建议用PCR产物纯化试剂盒（货号：130201）纯化片段。
- 如果有非特异扩增，则建议用胶回收试剂盒（货号：130101）回收片段。
- 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。
- 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。

无缝克隆反应的操作步骤：

1. 按照下表建立反应体系（可使用PCR管在冰上操作）

2 × Cloning Mix	5 μ l
Linear Vector (10-80 ng)	X μ l*
Insert(s)	Y μ l*
dd H ₂ O	To 10 μ l

* 载体一般用10-50 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，多片段连接的情况下，片段与片段之间摩尔比为1:1。

- 2. 轻轻混匀，在50°C反应30分钟（可在PCR仪器上进行），反应结束后，将PCR管置冰上后直接转化或者保存于-20°C。超过3个片段的连接，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（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）。

阳性克隆的鉴定：

可根据具体情况，选择菌落PCR鉴定，提取质粒（货号120302）进行限制性内切酶鉴定或测序鉴定。