



无缝克隆试剂盒
(Seamless Cloning Kit)
产品说明书

产品说明

货号	PLK011	产品形态	液体
储存条件	-20 °C 保存, 避免反复冻融	有效期	12 个月
运输条件	≤0°C		
活性定义	DNA 5'外切酶、DNA 聚合酶和DNA 连接酶		
质量控制	组分经检测无 RNase 残留		

产品组分

编号	组分名称	规格		
		PLK011S	PLK011M	PLK011L
1	2×Seamless Cloning Mix	100 μL (20rxn)	500 μL (100rxn)	1 mL (200rxn)

使用说明

1. 线性化载体的制备

推荐使用单/双酶切，或反向 PCR 扩增进行质粒的线性化，再通过胶回收的方法回收纯化获得线性化载体。如选用 PCR 扩增，推荐使用高保真聚合酶，尽量减少突变的引入。通过 PCR 方法获得线性化载体时，建议在 PCR 后使用 DpnI 进行消化，以消除模板质粒对于后续获取重组质粒的干扰。

2. 待插入片段的制备

(1) 引物设计原则

在插入片段正反向扩增引物的 5'端引入线性化载体两末端同源序列，使扩增后的插入片段 5'和 3'最末端分别带有和线性化克隆载体两末端对应一致的同源序列(15 - 25 bp，不包括酶切位点)。

引物设计方式为：

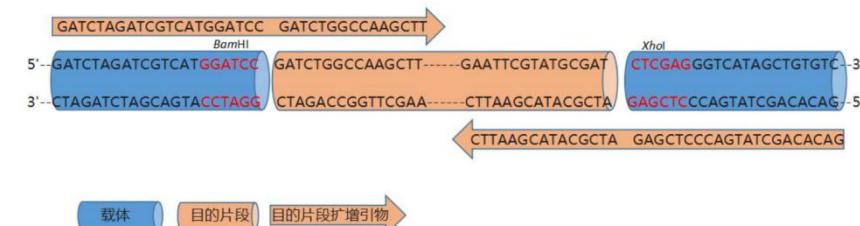
正向引物序列设计为：5'— 与载体上游末端重叠区域+酶切位点（可选）+基因插入片段正向引物序列—3'

反向引物序列设计为：5'— 与载体下游末端重叠区域+酶切位点（可选）+基因插入片段反向引物序列—3'

注意：

- a. 若载体为粘性末端，且 3'端突出，则引物设计必须包含突出部分；若 5'端突出，则引物设计可包含突出部分，也可不包含；
- b. 尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域进行克隆，当载体克隆位点上下游 25bp 区域内 GC 含量为 40%~60%为佳；
- c. 计算目的片段 PCR 扩增引物退火温度时，与载体末端同源序列不参与计算 Tm 值，只需计算参与目的 基因扩增的序列。

(2) 单个插入片段引物设计（以 Bam HI/Xho I 双酶切线性化载体为例）

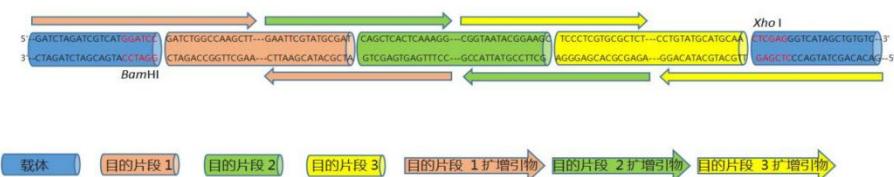


插入片段引物设计为：

F (5'-3') : GATCTAGATCGTCAT+GGATCC (可选)+GATCTGCCAAGCTT

R (5'-3') : GACACAGCTATGACC+CTCGAG (可选)+ATCGCATAACGAATT

(3) 多个插入片段引物设计（以 Bam HI/Xho I 双酶切线性化载体为例）



插入片段引物设计为：



Insert 1 F (5'-3') : GATCTAGATCGTCAT+GGATCC (可选) +GATCTGGCCAAGCTT

Insert 1 R (5'-3') : CCTTGAGTGAGCTG+ATGCATACGAATT

Insert 2 F (5'-3') : GAATTCGTATGCGAT+CAGCTCACTCAAAGG

Insert 2 R (5'-3') : AGAGCGCACCGAGGGA+GCTTCCGTATTACCG

Insert 3 F (5'-3') : CGGTAATAACGGAAGC+TCCCTCGTGCCTCT

Insert 3 R (5'-3') : GACACAGCTATGACC+CTCGAG (可选) +TTCGATGCATACAGG

3. 进行重组反应

(1) 线性化载体与插入片段的使用量计算

10 μ l 反应体系中, 对于单片段同源重组反应, 最适克隆载体使用量为 0.03 pmol,

插入片段使用量为 0.09 pmol (载体与插入片段摩尔比为 1:3 (1~10) 即:

载体用量 (0.03pmoL) = [0.03×0.325×2 × 载体碱基对数] ng

对应片段使用量 (0.09pmoL) = [0.09×0.325×2 × 片段碱基对数] ng

例如, 将长度为 1 kb 的目的片段克隆至长度为 4kb 的载体时, 载体的最适使用量应为: 0.03×0.325×2 ×4000=78 ng; 目的片段最适使用量应为: 0.09×0.325×2 ×1000=58.5ng。

注意:

a.当插入片段长度大于克隆载体时, 最适克隆载体与插入片段使用量的计算方式应互换, 即将插入片段 当做克隆载体, 克隆载体当做插入片段进行计算。

b.线性化克隆载体的使用量应在 50 - 200 ng 之间; 插入片段扩增产物的使用量应在 10 - 200 ng 之间, 若插入片段的长度小于 200bp, 则插入片段应使用 5 倍载体用量。当使用上述公式计算 DNA 最适使用量超出这个范围时, 直接选择最低/最高使用量即可。

c. 线性化载体和目的片段扩增产物不进行 DNA 纯化直接使用时, 加入总体积应不超过反应体系体积的 1/5, 10 μ l 体系即 2 μ l。

(2) 体系配制

于冰水浴中配制如下反应体系:

组分	使用量 (1~2 个片段)	使用量(≥3 个片段)
2 ×Seamless Cloning Mix	5 μ l	5 μ l
每个片段与载体摩尔比	3 : 1	1 : 1
线性化载体	X μ l (50 - 200 ng)	X μ l (50 - 200 ng)
插入片段/PCR 产物	Y μ l (10 - 200 ng)	Y μ l (10 - 200 ng)
ddH ₂ O	Up to 10 μ l	Up to 10 μ l

注: 若是片段、载体加入量过多, 超过 10 μ l 反应体积, 可等比例放大实验体系。

(3) 反应条件

使用移液器轻轻吸打混匀(请勿振荡混匀), 短暂离心将反应液收集至管底。将上述反应体系置于 50°C 孵育 30 min (插入 1-2 个片段) 或 60 min (同时插入 3-5 个片段)。反应完成后如不能立即进行后续操作, 可将反应样品保存于-20°C。

4. 转化

- (1) 在冰上解冻克隆感受态细胞 (如: DH5 α 、 BL21 、 TOP10)。
- (2) 取 10 μ l 重组产物加入到 100 μ l 感受态细胞中, 轻弹管壁混匀(请勿振荡混匀), 冰上静置 30 min。
- (3) 42°C 水浴热激 90 sec, 立即置于冰水上冷却 3-5 min。
- (4) 加入 500 μ l SOC 或 LB 培养基(不添加抗生素), 37°C 200 rpm 孵育 1h。
- (5) 将相应抗性的 LB 固体培养基平板在 37°C 培养箱中预热。
- (6) 5000 rpm 离心 3 min, 弃掉 500 μ l 上清。用剩余培养基重悬菌体后全部涂布到含适当抗生素的 LB 平板上, 平板正放 5min 固定涂布菌液。
- (7) 37°C 培养箱中倒置培养 12- 16 h。

5. 阳性克隆鉴定

PCR 鉴定: 最好是一端的引物用载体上的引物, 另一端的引物用片段的引物, PCR 鉴定大小。

双酶切鉴定: 用片段两头的酶切位点鉴定大小。

测序验证: 用载体的通用引物测序, 进行序列分析。