



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:

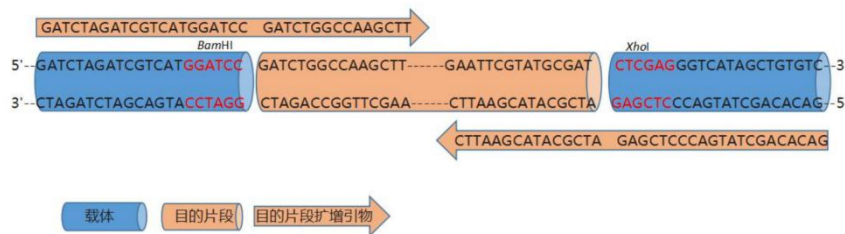
正向引物序列设计为: 5'— 与载体上游末端重叠区域+酶切位点 (可选)+基因插入片段正向引物序列—3'

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:

- 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;
- 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;
- 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。

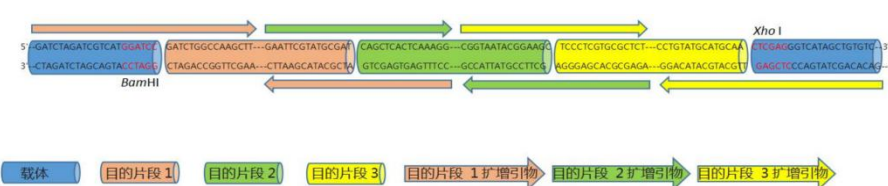
(2) 单个插入片段引物设计 (以 Bam HI/Xho I 双酶切线性化载体为例)



### 插入片段引物设计为:

F (5'-3') : GATCTAGATCGTCAT+GGATCC (可选)+GATCTGGCCAAGCTT  
R (5'-3') : GACACAGCTATGACC+CTCGAG (可选)+ATCGCATACGAATTC

(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' ) : CCTTTGAGTGAGCTG+ATCGCATACGAATTC  
Insert 2 F ( 5'-3' ) : GAATTCGTATGCGAT+CAGCTCACTCAAAGG  
Insert 2 R ( 5'-3' ) : AGAGCGCACGAGGGA+GCTTCCGTATTACCG  
Insert 3 F ( 5'-3' ) : CGGTAATACGGAAGC+TCCCTCGTGCGCTCT  
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

10μl 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 1/5，10μl 体系即 2 μl。

(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	5μl	5μl
每个片段与载体摩尔比	3 : 1	1 : 1
线性化载体	X μl（50 - 200 ng）	X μl（50 - 200 ng）
插入片段/PCR 产物	Y μl（10 - 200 ng）	Y μl（10 - 200 ng）
ddH <sub>2</sub> O	Up to 10 μl	Up to 10 μl

注：若是片段、载体加入量过多，超过 10μl 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℃ 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℃。

4. 转化

(1) 在冰上解冻克隆感受态细胞（如：DH5α 、BL21 、TOP10）。

(2) 取 10 μl 重组产物加入到 100 μl 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℃水浴热激 90 sec，立即置于冰水上冷却 3-5 min。

(4) 加入 500μl SOC 或 LB 培养基(不添加抗生素)，37℃ 200 rpm 孵育 1h。

(5) 将相应抗性的 LB 固体培养基平板在 37℃培养箱中预热。

(6) 5000 rpm 离心 3 min，弃掉 500 μl 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℃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。