

# Seamless cloning Master Mix

产品编号: B632219

包装规格: 20/40 rxns

## Kit Contents

Component	20 rxns	40 rxns
Seamless cloning Master Mix	170 $\mu$ l	170 $\mu$ l x2
Sterilized ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1 mlx2
Protocol	1	1

## 运输与保存

低温运输, -20°C 保存, 避免反复冻融。

## 产品简介

Seamless Cloning master mix 是一种即用型无缝克隆产品。无缝克隆是一种新型、快速、简洁的克隆方法, 可以同时多个 DNA 片段克隆到任何载体中。只需插入的 DNA 片段末端与载体末端具有 15-20 个同源碱基序列就可以在载体的任意位点完成克隆重组。

## 操作过程

### 1. 载体线性化

采用酶切或 PCR 扩增方法将载体线性化。

#### a. 酶切 :

载体酶切一定要完全, 否则未切开的载体会影响后续的阳性克隆鉴定。

选取合适的位点, 单酶切或双酶切皆可。但为了提高阳性率, 我们建议您采取双酶切方法获得线性化载体。

酶切获得的载体可以是 3' 突出或 5' 突出, 也可以是平末端线性化载体。但 3' 突出或平末端的线性化载体可以提高克隆的效率。酶切获得的线性化载体需进行纯化后使用。

#### b. PCR

选取合适的位点, 设计正向和反向引物, 引物长度一般在 18-20bp 左右, 一般载体长度均大于 3kb, 建议用高保真的聚合酶扩增为了避免模板质粒 DNA 对后续试验的影响, 建议载体酶切后再用 PCR 扩增, 自连背景更低, 阳性率更高。

### 2. 目的DNA片段的PCR扩增

扩增目的 DNA 片段的引物 5' 末端要附加与载体末端相同的碱基序列 (15-20 bp), 因此, PCR 每条引物长度至少在 35-40bp, 包括 5' 端与载体同源的 15bp 以及目的片段特异性序列 20-25 bp。

(注意事项: 如果是表达载体克隆构建, 引物设计完全后, 请注意检查读码框的正确。)

#### ● 引物设计方法

引物设计是很重要的, 在设计引物时同样要遵循引物设计的基本原则, 只不过上下游引物要加上 15-18bp 的载体同源序列。

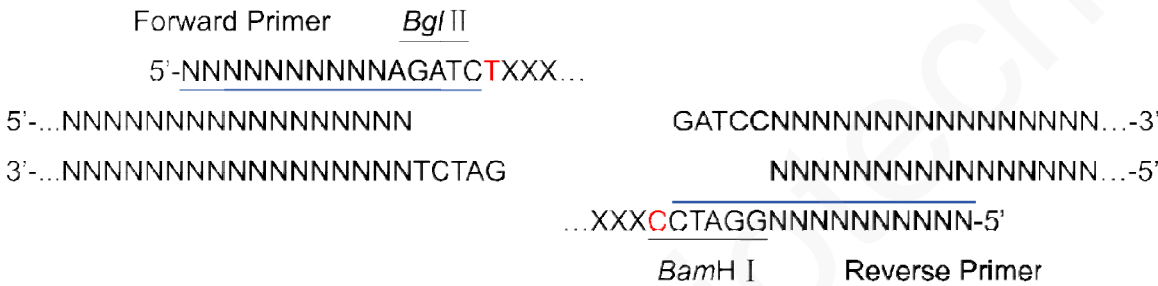
引物序列包括是: 5'-15-20bp 同源序列-所需酶切位点序列-特异性引物序列-3'。

载体酶切后有5'端突出、3'端突出或平末端三种情况。载体同源序列如何添加主要分以下三种情况：

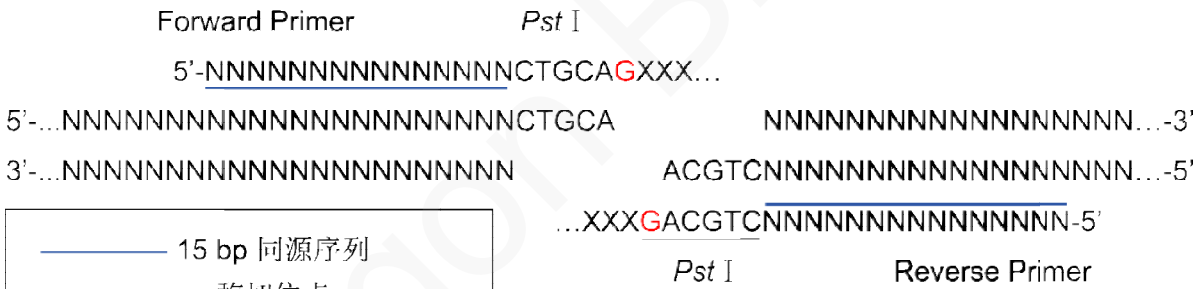
1.载体切开后为平末端



2. 载体切开后5'端突出，突出序列计算在同源序列的15 bp之内



3.载体切开后3'端突出，突出序列不计算在同源序列的15 bp之间



注：15bp 同源序列不要求严格从载体最末一个碱基计算，但载体末端非同源序列会降低重组效率。当末端非同源序列达到20bp 时，重组效率会下降一倍。

3. 目的片段与载体的重组
4. 将目的DNA片段和线性化载体以一定的摩尔比加到PCR管中进行重组反应。

以20ul 反应体系为例：

组分	加入量
Seamless cloning Master Mix	8.5 μl
线性化载体	50 ng
插入片段	X ng
Sterilized ddH <sub>2</sub> O	补足至 20 μl
50℃ 反应 30-60min，反应时间取决于插入片段的数量。	

注意：目的片段与载体的摩尔比在 3 : 1-10 : 1 之间，摩尔比低于 3 : 1 效率会降低

## 5. 转化

- a. 加入 4  $\mu$ l 的反应液到感受态细胞中，轻弹数下，置冰上孵育 30 分钟。
- b. 42℃水浴中热激 90 秒后快速放入冰上 5 分钟。
- c. 加入 500  $\mu$ l SOC 液体培养基，37℃孵育 45-60 分钟。
- d. 4000 rpm 离心 3 分钟收集菌体，根据需要一定量的菌体均匀的涂布在含抗生素平板上