

快速重组无缝克隆试剂盒

货号：HKR042

【产品信息】

| 产品名称 | 产品货号 | 规格 | 有效期 |
|-------------|--------|---------|-------|
| 快速重组无缝克隆试剂盒 | HKR042 | 50 rxns | 12 个月 |

【产品简介】

与传统的克隆方法不同，无缝克隆技术基于基因重组原理，在目的基因引物 5' 端引入了一段与线性化载体末端同源的碱基序列（一般为 15-20 bp），在重组酶的作用下即可将目的基因插入线性化载体中，是一种操作简单、高效且快速的 DNA 定向克隆技术。

快速重组无缝克隆试剂盒一次反应可完成单个至多个 DNA 片段的重组。其中经优化的 Mix 预混了重组酶和反应缓冲液，并添加了辅助因子，可显著提高克隆的重组效率和对杂质的耐受度，最快仅需 5 分钟即可完成单片段重组，且阳性率高达 95% 以上。

【试剂组成】

| 货号 | 品名 | 规格 |
|----------|--|-------------|
| HKR042-1 | Seamless Assembly Mix Plus | 250 μ L |
| HKR042-2 | pUC19 Control Plasmid, Linearized (Ampr, 40 ng/ μ L) | 5 μ L |
| HKR042-3 | 500 bp Control Fragment (20 ng/ μ L) | 5 μ L |

【储存与运输】

低温运输，-20°C，避免反复融冻，24个月有效。

【使用方法】

常规染色脱色方法：

1. 载体线性化处理
2. 选择合适的克隆位点，对环形载体进行线性化处理。以下两种方法任选其一即可。
3. a. 酶切处理
4. 建议使用双酶切，可减少载体自连，降低假阳性克隆概率。若使用单酶切，建议适当延长酶切反应时间。酶切处理后，建议进行电泳验证，并对线性化载体切胶纯化。
5. b. 反向 PCR 扩增
6. 以预线性化质粒为模板，推荐选择 MCE 高保真聚合酶（2× High-Fidelity PCR Master Mix, Cat. No. : HY-K0533）进行扩增。

2. 目的基因扩增

a. 目的基因引物设计原则

无缝克隆反应要求目的基因与相邻片段具有 15-20 bp 的末端同源性，所以目的基因上下游引物的 5' 端均需包含一段与已知线性化载体末端同源的碱基序列，引物总长度最好不要超过 40 bp， T_m 值一般在 55-65°C，GC 含量一般在 40-60%。

上游引物 (Primer F) :

5'—上游载体末端同源序列 + 酶切位点 (可选择) + 目的基因特异性正向序列—3'

下游引物 (Primer R) :

3'—目的基因特异性反向序列 + 酶切位点 (可选择) + 下游载体末端同源序列—5'

注：1) 目的基因特异性正\反向序列即常规插入片段正\反向扩增引物序列。

上游\下游载体末端同源序列为线性化载体最末端序列 (用于同源重组)。

b. 目的基因 PCR 扩增

推荐选择 MCE 高保真聚合酶 (2× High-Fidelity PCR Master Mix, Cat. No. : HY-K0533) 进行扩增。扩增结束后，建议对 PCR 产物进行纯化后再用于后续无缝克隆反应。

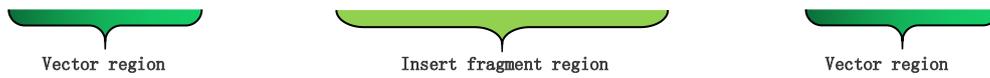
Primer F F

GATGCGTATCGGTGATTGATTAG + ATGAGCAAGGGAGAAGAAGT

5' - CAGATGCGTATCGGTGATTGATTAG -3' ATGAGCAAGGGAGAAGAAGT — GGGATGAAATTGTCAGTGTAA 5' - CTAGCGAAGTATAGTCGGATCAAAGT -3'
 3' - GTCTACGCATAGCCACTAAGTCCTAG -5' TACTCGTTCCTCTTCTTGAG — CCTACTTTAACAGTCACATT 3' - GCTTGATCTAGGCCTAGTTGA -5'

CCTACTTTAACAGTCACATT + GCTTGATCTAGGCCTAGTTT

Primer R



a. Linearized vectors with 5' overhangs

Primer F

GATGCGTATCGGTGATTGATTAG + ATGAGCAAGGGAGAAGAAGT

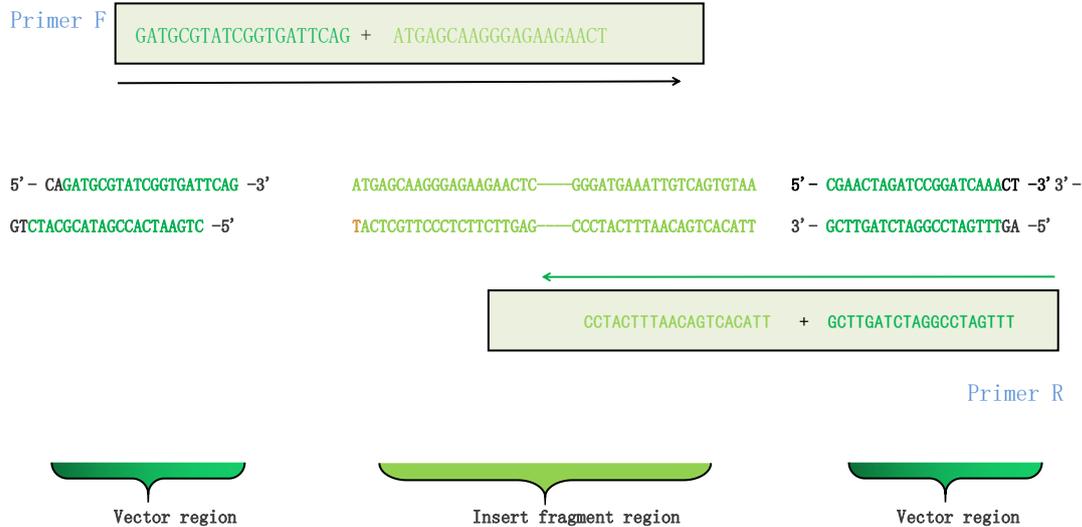
5' - CAGATGCGTATCGGTGATTGATTAG -3' ATGAGCAAGGGAGAAGAAGT — GGGATGAAATTGTCAGTGTAA 5' - CTAGATCCGGATCAAAGT -3'
 3' - GTCTACGCATAGCCACTA -5' TACTCGTTCCTCTTCTTGAG — CCTACTTTAACAGTCACATT 3' - GCTTGATCTAGGCCTAGTTGA -5'

CCTACTTTAACAGTCACATT + GCTTGATCTAGGCCTAGTTT

Primer R



b. Linearized vectors with 3' overhangs



C. Linearized vectors with blunt end

引物设计示意图

3. 无缝克隆

a. 在冰上配制如下反应体系:

| 组分 | 实验组 | 阴性对照 | 阳性对照 |
|----------------------------|---------------|---------------|--|
| Seamless Assembly Mix Plus | 5 μ L | 5 μ L | 5 μ L |
| 线性化载体 | 50-200 ng | 50-100 ng | pUC19 Control Plasmid, Linearized, 1 μ L |
| 目的基因 | 10-200 ng | / | 500 bp Control Fragment, 1 μ L |
| ddH ₂ O | To 10 μ L | To 10 μ L | To 10 μ L |

本反应体系最适载体用量为 0.03 pmol。

当插入单个目的基因时，目的基因与载体的最适摩尔比为 2:1。

当插入多个目的基因时，每个目的基因与载体的最适摩尔比为 1:1。

注：1) 若目的基因长度大于载体长度时，应互换载体与目的基因的用量，即将目的基因当做载体，将载体当做目的基因再进行计算。

2) 线性化载体的使用量在 50-200 ng 之间，目的基因的使用量在 10-200 ng 之间。若按照上述公式计算得到的使用量超出这个范围，建议直接选用最低/最使

用量。

3) 若目的基因小于 200 bp 时, 建议目的基因与载体的摩尔比为 5:1。

4) 若使用未经纯化的线性化载体或目的基因时, 加样体积不应超过总反应体积的 20%。

5) 载体或目的基因片段过长均会导致重组效率降低。

b. 用移液枪轻轻吹打混匀(切勿振荡), 短暂离心后置于 50° C 反应 5-60 min。

注: 1) 推荐使用 PCR 仪等温控较精准的仪器, 反应时间过长或过短均会降低克隆效率。

当插入 1-2 个片段时, 推荐反应 5-15 min; 当插入 3-5 个片段时, 推荐反应 15-30 min。

3) 若载体大于 10 kb 或目的基因大于 4 kb 时, 建议延长反应至 30-60 min。

c. 将反应液短暂离心后置于冰上冷却, 用于后续转化。

注: 重组产物可于 -20° C 暂存一周, 待需要时解冻转化即可。

4. 转化

a. 在冰上解冻 100 μ L 感受态细胞。禁止直接用手化冻, 会影响感受态细胞的活性。

b. 在解冻后的感受态细胞中, 加入 10 μ L 重组产物, 轻轻混匀, 在冰上放置 30 min。

c. 将上述反应液于 42° C 水浴热激 45-60 s, 迅速放到冰上冷却 5 min。

d. 加入 500 μ L LB 或者 SOC 液体培养基(不含抗生素), 37° C, 180 rpm 培养 1 h。

组分。

e. 将菌液离心浓缩后涂布在含相应抗生素的固体平板上, 37° C 倒置培养过夜。

注: 1) 不同感受态细胞的阳性克隆率有所区别, 推荐使用转化效率较高的感受态细胞。

2) 阳性对照平板通常出现大量菌落, 而阴性对照几乎没有菌落。

5. 阳性克隆子的筛选与鉴定

过夜培养后, 理论上重组平板会出现数百个单菌落, 挑取单菌落进行验证。以下两种方法任选其一即可。

注: 为确保实验准确性, 建议将以下两种方法筛选出的阳性克隆子测序。

a. 酶切验证: 挑取单菌落接种至含抗生素的液体培养基中培养, 提取质粒后进行酶切验证。

b. 菌落 PCR: 挑取单菌落至 10 μ L ddH₂O, 95° C 裂解 10 min。取 1 μ L 裂解液作为模板, 直接进行菌落 PCR。菌落 PCR 扩增时至少使用一条通用引物, 以免造成假阳性。

【注意事项】

1) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

2) 本产品仅作科研用途。

【常见问题】

| 问题 | 原因 | 解决办法 |
|---------------|---------------|---|
| 转化效率低 | 感受态细胞效率低 | 使用新制备或妥善保存的感受态细胞；在冰上化冻感受态细胞。 |
| | DNA 片段比例不佳 | 根据说明书推荐的最适用量和比例配制反应体系。用超微量核酸蛋白检测仪等测定线性化载体及目的基因的浓度，且需确保 OD260/OD280 在 1.8-2.0。 |
| | DNA 片段纯度不够 | 对线性化载体和目的基因切胶纯化，并将纯化产物溶解在 ddH ₂ O 中。切勿使用 Tris-EDTA 等缓冲液。 |
| 多数克隆不含目的基因 | 载体线性化不完全 | 加大快速内切酶的使用量；延长酶切反应时间；使用胶回收纯化酶切产物。 |
| | 平板抗性不足 | 使用正确抗生素；使用新制备的抗生素平板。 |
| 多数克隆含有不正确插入片段 | 非特异性 PCR 扩增产物 | 优化 PCR 体系，使用高保真酶，提高特异性；对 PCR 产物进行切胶回收；鉴定更多克隆。 |