



产品说明书

产品名称	Seamless Cloning Kit(无缝克隆试剂盒)
货号	BGD4002
产品形态	液体
储存条件	-20℃保存，避免反复冻融
运输条件	≤0℃
产品成分	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
有效期	12 个月

产品说明

Seamless Cloning Kit(无缝克隆试剂盒)是一种基于插入片段和线性化载体的末端进行同源重组的基因克隆试剂盒。将载体进行线性化，在插入片段正/反向 PCR 引物 5'端引入线性化载体的末端序列，使得 PCR 产物 5'和 3'最末端分别带有和线性化载体两末端一致的序列(15 - 20 bp)，这种两端带有载体末端序列的 PCR 产物和线性化载体按一定比例混合后，在特定酶混合物的催化下，50℃反应 15~60min 即可进行转化，完成定向克隆。

产品形式

编号/货号	产品组成	规格(50rxn / 10μL Reaction)
BGD4002A	2×Seamless Cloning Mix	250μL
BGD4002B	Linearized pUC19 (Amp ^r , 30ng/μL)	5μL
BGD4002C	DNA fragment (850bp, 30ng/μL)	5μL

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：

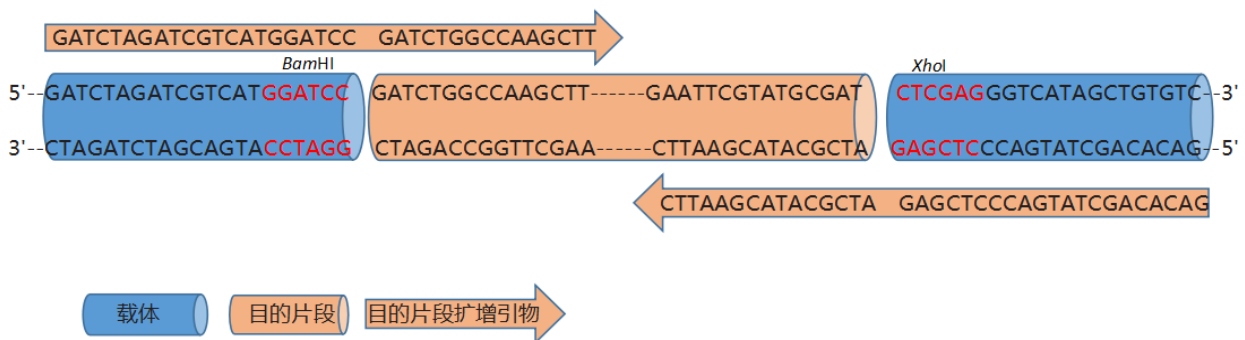
正向引物序列设计为：5'—与载体上游末端重叠区域+酶切位点（可选）+基因插入片段正向引物序列—3'

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 T_m 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）

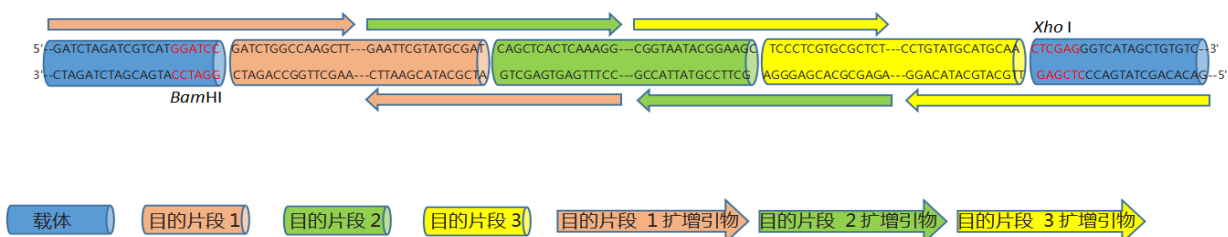


插入片段引物设计为：

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

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 0.06 pmol (载体与插入片段摩尔比为 1:2 (1~10)) 即:

载体用量 (0.03pmol) = $[0.03 \times 0.325 \times 2 \times \text{载体碱基对数}] \text{ ng}$

对应片段使用量 (0.06pmol) = $[0.06 \times 0.325 \times 2 \times \text{片段碱基对数}] \text{ ng}$

例如, 将长度为 1 kb 的目的片段克隆至长度为 3 kb 的载体时, 载体的最适使用量应为:

$0.03 \times 0.325 \times 2 \times 3000 = 58.5 \text{ ng}$; 目的片段最适使用量应为: $0.06 \times 0.325 \times 2 \times 1000 = 39 \text{ ng}$ 。

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
2×Seamless Cloning Mix	5 μ L
线性化载体	X μ L (50 - 200 ng)
插入片段/PCR 产物	Y μ L (10 - 200 ng)
ddH ₂ O	Up to 10 μ L

(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。