

# 单片段快速重组预混液

2× SingleSeamless Mix



## 产品信息:

|                      |                  |
|----------------------|------------------|
| 组分                   | CL205-01 (100 次) |
| 2×SingleSeamless Mix | 500μl            |

保存条件: -20℃保存

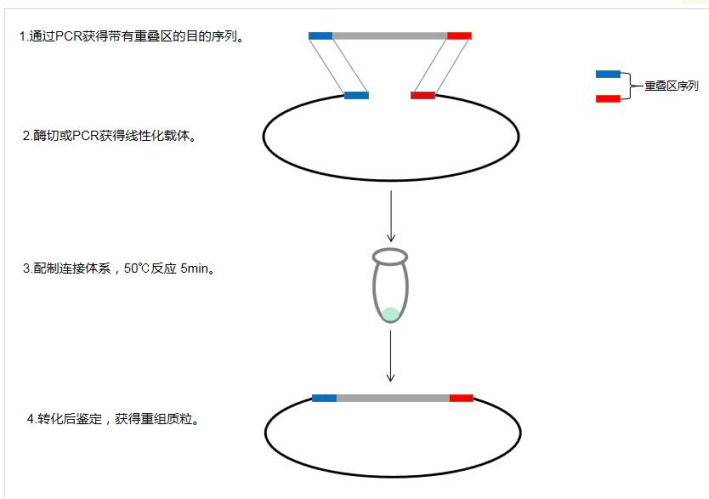
## 产品介绍:

区别于拓扑克隆、TA 载体克隆和酶切克隆等常规克隆方法,无缝克隆技术可在重组酶的作用下,只需一步反应,便可将片段克隆到任何载体中的任意位置得到重组质粒。通过设计同源重组臂(15-25bp),可将单一片段定向克隆至载体任意位置,最终得到无缺口闭环质粒。

## 产品特点:

1. 简单、快速、精确、定向克隆,连接过程只需要 5 分钟。
2. 只需要简单的 PCR 扩增就可以制备目的片段,不需要内切酶、连接酶和磷酸化酶。
3. 线性化载体的制备可以通过内切酶酶切或 PCR 扩增获得。

## 实验原理:



## 操作步骤:

### 1. 线性化载体的制备

#### (1) 酶切制备线性化载体

利用单酶切或双酶切对克隆载体进行线性化处理，一般双酶切比单酶切线性化效果好。载体的完全线性化是无缝连接成功的关键。电泳方法判定载体线性化是否完全时，一定要用未酶切的质粒做对照一起电泳。

在质粒载体上选择的重组区域应为无重复序列且碱基分布均匀的区域。重组区域内 G+C%含量在 40%~60%范围之内，重组效率将达到最高。单酶切或双酶切方式制备的线性化载体无需进行末端脱磷酸化处理。

#### (2) 反向 PCR 扩增制备线性化克隆载体

以载体质粒 DNA 为模板，克隆位点为分界点，设计一对反向引物用高保真 DNA 聚合酶扩增，制备用于重组的线性化载体。为防止残留环状载体质粒模板对克隆阳性率的影响。需要采用胶回收方法或者 *Dpn* I 消化结合胶回收的方法纯化线性化载体。

### 2. 目的 DNA 的 PCR 扩增

插入片段可用任意 PCR 酶 (Taq 酶或高保真酶) 扩增，无需考虑产物末端有无 A 尾 (重组过程中将被去除，在最终质粒中不会出现)。建议使用高保真聚合酶进行扩增以减少扩增突变的发生。PCR 结束后，取少量产物进行琼脂糖电泳以检验扩增产物长度和特异性。非特异性扩增和引物二聚体的存在会严重影响克隆效率，建议用胶回收试剂盒纯化目的片段。

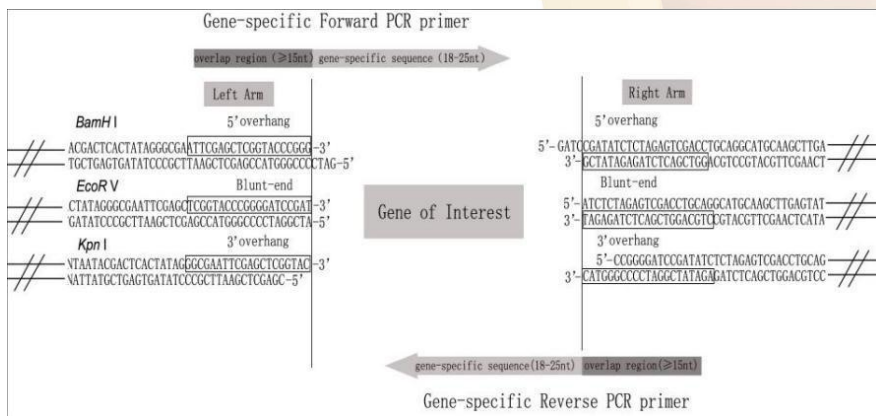
### 3. 单一片段引物设计

该产品可以克隆任何 PCR 扩增产物，但是扩增引物有特殊的设计要求。引物序列包括 5'端 15-25nt 的用于同源重组的重叠区域和 3'端的目的基因的特异性引物组成。

下图为单片段克隆时的引物设计要求示意图。

例如，*Bam*HI，*Eco*R V 和 *Kpn* I 酶切位点酶切后分别产生 5'突出末端，平末端和 3'突出末端。**重叠区碱基长度设计在 15-25nt 之间，基因特异性引物紧挨着重叠区序列，长度通常为 18-25nt**。按照下图这种设计方法，制备重组载体时使用的内切酶的酶切位点将不存在。如扩增目的片段的引物中保留了酶切位点或额外添加了新的酶切位点，那么原始的酶切位点或新添加的酶切位点将出现在最终的重组质粒序列中。下图仅显示了单酶切的状况，实

际操作中可为三种末端结构的其中一种或任意两种组合。



#### 4. 载体片段的重组连接

按下表，在一个 0.2ml PCR 管中依次加入

| 组分                     | 体积    |
|------------------------|-------|
| PCR 产物 (50- 100ng/ μl) | 1 μl  |
| 线性化载体(50- 100ng/ μl)   | 1 μl  |
| 2×SingleSeamless Mix   | 5 μl  |
| 补水至总体积                 | 10 μl |

#### 注意：

1. 载体用量一般在 50-100ng 较好。载体和片段的摩尔比为 1:1 至 1:3 。片段小于 200bp 时，片段用量可增加至载体的 5 倍量。
2. 50℃ 反应 5 分钟。

#### 5. 转化

请按照感受态细胞产品说明书进行操作。

#### 6. 阳性克隆鉴定：

- (1) 菌落 PCR 方法；
- (2) 限制性酶切分析方法；
- (3) DNA 测序分析方法。