

产品信息 (Product Details)

概述 (Summary)

产品中文名

无缝克隆试剂盒

产品描述 (Description)

1.产品介绍

无缝克隆是一种新型、快速并且高效的Gibson Assembly DNA定向克隆技术，可以同时多个DNA片段克隆到任何载体中,并且最终构建的克隆没有任何额外的碱基序列，因此被称作“无缝克隆”。

和传统的基因克隆方法相比，本试剂盒的无缝克隆技术有多方面的优势：（1）操作更简单，只需要一次反应即可完成；（2）对酶切位点无要求，可以把目的片段插入到任意载体的任意位点；（3）连接片段之间不会引入任何多余的序列，是真正的无缝克隆；（4）阳性克隆率高，降低克隆筛选的工作量。

本试剂盒操作简单，仅需将载体在插入位点进行线性化，同时将目的片段两端引物与载体插入位点同源的15-25bp序列，将线性化的克隆载体和带有同源序列的PCR片段按合适比例混合，并加入2×Master Mix，在重组酶的催化下，50℃反应30min即可快速完成定向克隆，阳性率高达90%以上。试剂盒中2×Master Mix预混了DNA外切酶、DNA聚合酶、连接酶和重组反应所需缓冲液，并添加了特殊的酶激活组分，可显著提高重组克隆效率，可以一次实现多至3-6个片段的顺序拼接克隆。

2.试剂盒原理示意图

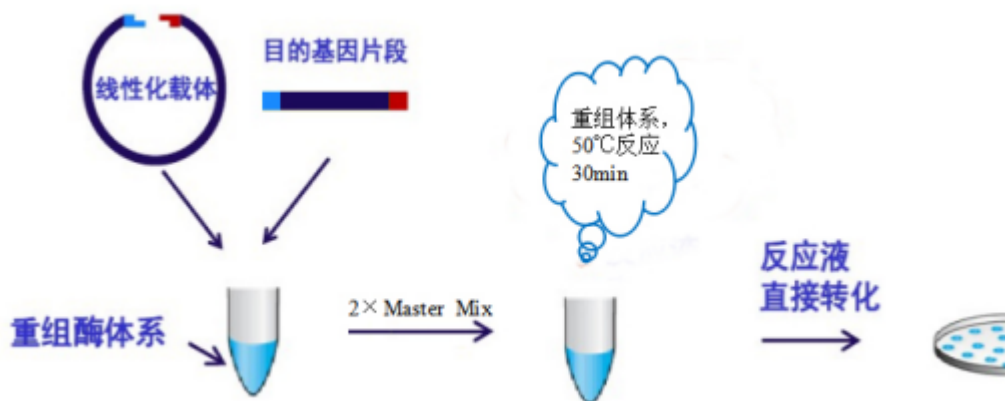


图1. 无缝克隆试剂盒原理示意图。单酶切/双酶切获得线性化载体。扩增与载体带有同源臂的目的片段（蓝色和红色部分为同源部分）。按一定的比例将二者混合在2×Master Mix预混液中，50℃反应30min后直接转化E.coli即可。

产品优势 (Advantage)

和传统的基因克隆方法相比，本试剂盒的无缝克隆技术有多方面的优势：

- (1) 操作更简单，只需要一次反应即可完成；
- (2) 对酶切位点无要求，可以把目的片段插入到任意载体的任意位点；
- (3) 连接片段之间不会引入任何多余的序列，是真正的无缝克隆；
- (4) 阳性克隆率高，降低克隆筛选的工作量。

储存条件 (Storage)

于-20℃避光保存12个月，避免反复冻融。

运输方式 (Shipping)

干冰运输。

Note

For research use only .

使用方法 (Standard Operating Procedure)

1.线性化载体的制备

线性化载体制备的两种方法：

- (1) 在目标载体质粒上选取合适的位点，进行单酶切或者双酶切，酶切后割胶纯化；
- (2) 反向PCR扩增载体，在线性化位点设计一对互补的引物，进行扩增。

注意：载体质粒单酶切容易造成载体切割不完全和载体自连，导致假阳性的产生，所以尽可能的选择双酶切。请务必割胶回收线性化的载体，否则残余的环状质粒会产生背景菌落。一般回收后的线性化载体浓度需要>15ng/μl。

2. 目的基因片段的制备

设计引物进行目的片段的扩增：

- (1) PCR引物必须包含两个部分，引物的5'端必须包含与载体末端完全同源的15-25bp碱基，引物的3'端必须包含靶基因特异引物序列。
- (2) 每条引物的3'端必须具有目的基因特异性，长度为15-25bp，GC%为40%-60%，退火温度T_m为58℃-65℃。PCR产物经跑胶，割胶纯化待用。
- (3) 当有多个片段插入时，首片段和末尾片段引物的5'端必须包含与载体末端完全同源的15-25bp碱基。其余中间片段引物的5'端必须包含与前一个片段15bp左右同源序列，3'端必须包含与后一个片段15bp左右同源序列。

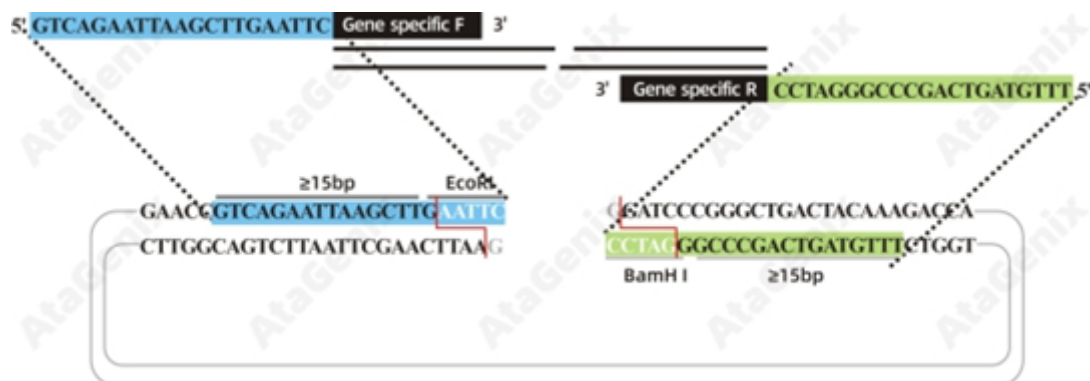


图3.目的片段引物设计示意图

3.反应体系的设置

参考下表在冰上配制重组反应体系：

2 ×Master Mix	5 μ l
Linearized vector	50-200ng
Purified PCR Fragment	20-200ng
Total	10 μ l

反应条件：插入单个片段，一般需50℃反应30min；随着插入片段的增多，长度的加大，反应时间随之延长，一般需要45-60min。

注意：线性化载体与目的片段的加入量可以根据各自的浓度，片段的长度自行调整。目的片段与线性化载体的摩尔比在3:1左右，过高或过低都会降低重组效率。

4.转化及阳性克隆的鉴定

- (1) 取100 μ l待转化感受态，置于冰上解冻。
- (2) 向上述感受态细胞悬浮液中加入10 μ l重组好的反应液（按第3步操作），轻轻混匀，不能震荡，将该混合物置于冰上30 min。
- (3) 在42℃的水浴中热激90 sec，立即置于冰上保存2 min，再加入500 μ l LB培养基（不含抗性），37℃摇床200rpm震荡培养1h左右。
- (4) 取上述转化混合液200-300 μ l，涂布在选择性固体培养基上（含相应抗生素），待菌液被培养基充分吸收后，将平板倒置于37℃恒温培养箱中培养过夜。
- (5) 挑平板上的克隆进行菌落PCR，或提质粒双酶切鉴定阳性克隆。

组分&说明 (Component & Instruction)