

使用前请务必仔细阅读英文说明书

产品编号：C5891

## 产品简介：

Seamless Assembly是一种简单、快速、高效的DNA定向克隆技术，该技术突破传统，不依赖内切酶和连接酶，不受限制性内切酶酶切位点的限制，利用同源重组的原理，可将任何DNA片段克隆至任何载体的任何位点。反应时间+转化时间短至20min，阳性率达95%以上（反应原理如下）。



## 产品特点：

- 简单、快速、高效地定向克隆DNA片段，阳性率达95%以上；
- 不依赖内切酶和连接酶，不受限制性内切酶酶切位点的限制；
- 可同时定向克隆两个或多个DNA片段；
- 反应时间+转化时间短至20min；
- PCR产物（仅有目的条带、无非特异条带和引物二聚体）可直接进行重组反应，无需纯化。

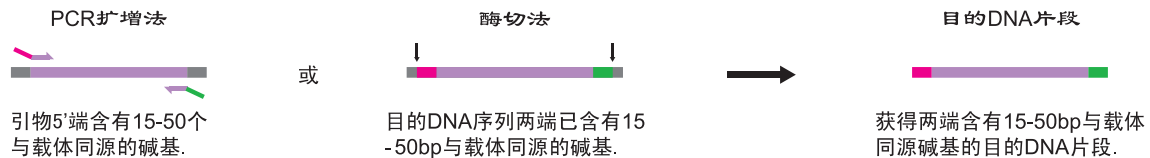
## 线性化载体的制备：

可通过单酶切、双酶切或PCR扩增制备，如果线性化不彻底，将会导致阴性克隆的产生，推荐使用双酶切或PCR扩增的方法。



## DNA片段的制备：

1. DNA片段可通过PCR扩增或酶切的方法制备，PCR扩增片段无需纯化即可用于重组反应。



2. PCR扩增法引物设计原则：

- 引物的5'端必须包含15-50个与线性化载体末端同源的碱基序列，以便PCR扩增片段能与线性化载体进行重组反应。
- 当载体+目的基因>10kb时，建议同源臂设计的长一些，如20-50个，这可大大提高重组效率。
- 当多个片段同时进行重组时，建议同源臂设计的长一些，如20-50个，这可大大提高重组效率。
- 设计引物时，同源臂(载体末端序列)尽量避开高GC、PolyN、重复序列等区域，当同源臂含重复序列(如His-Tag)时，同源臂需设计的长一些，应包括全部重复序列，及重复序列两端各5-10个碱基，但同源臂不能超过80bp。

	5' Forward Primer 5'-ATG TTG TGA CGA CAG NNNNNNNNN...-3'	
Linearized Vectors with 5' Overhangs	5'...ACG ATG TTG TGA CGA CAG-3' 3'...TGC TAC AAC ACT GCT GTC CTAG-5'	5'-AGCT TCA GGT CAC TTA ACG CCG...-3' 3'-AGT CCA GTG AAT TGC GGC...-5' 3'...NNNNNNNNNN AGT CCA GTG AAT TGC-5' 3' Reverse Primer
	5' Forward Primer 5'-TG TTG TGA CGC TGCA NNNNNNNNN...-3'	
Linearized Vectors with 3' Overhangs	5'...ACG ATG TTG TGA CGC TGCA-3' 3'...TGC TAC AAC ACT GCG-5'	5'-GGT CAC TTA ACG CCG...-3' 3'-ACGT CCA GTG AAT TGC GGC...-5' 3'...NNNNNNNNNN ACGT CCA GTG AAT TGC-5' 3' Reverse Primer
	5' Forward Primer 5'-ATG TTG TGA CGA GAT NNNNNNNNN...-3'	
Linearized Vectors with Blunt ends	5'...ACG ATG TTG TGA CGA GAT-3' 3'...TGC TAC AAC ACT GCT CTA -5'	5'-ATC GGT CAC TTA ACG CCG...-3' 3'-TAG CCA GTG AAT TGC GGC...-5' 3'...NNNNNNNNNN TAG CCA GTG AAT TGC-5' 3' Reverse Primer

## 重组反应:

1. 按照如下体系操作:

DNA片段和线性化载体	0.5–5 $\mu$ L
2×Seamless Master Mix	5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	X $\mu$ L
总反应体积	10 $\mu$ L

2. 50℃反应15min, 然后将离心管放置于冰上。如当天不进行转化实验, 请将连接产物放-20℃保存。

注意: ① 线性化载体建议使用20-60ng, DNA片段按照与载体摩尔比3:1使用, DNA片段之间摩尔比按1:1到1:2使用;

② 阳性对照反应: 使用试剂盒提供的Linearized Control Cloning Vector(2.8kb 30ng/ $\mu$ l) 1 $\mu$ L, Control Fragment I (600bp 20ng/ $\mu$ l) 1 $\mu$ L, 和Control Fragment II (900bp 30ng/ $\mu$ l) 1 $\mu$ L, 按照如上体系操作, 并50℃反应15min, 转化后菌液涂在含有IPTG、X-gal的培养基平板上, 过夜培养。白色菌落为阳性克隆, 说明有基因的插入, 蓝色菌落为没有插入片段的空载体。

## 转化:

1. 取5 $\mu$ L连接液至50-100 $\mu$ L刚刚融化的DH10B感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰浴2-30min。

2. 42℃水浴中热激30sec。

3. 立即放置于冰上静置2min。

4. 加入300-500 $\mu$ L无菌SOC或LB培养基(不含抗生素), 37℃, 200-250rpm振荡培养60min。

注: <1000bp单个片段连高拷贝AMP载体可以不复苏, 直接涂平板。

5. 吸取200 $\mu$ L菌液铺板, 为得到更多克隆, 可先3000g离心2min, 弃掉部分上清, 用移液器轻吹菌体, 至充分悬浮, 取全部菌液涂板, 然后37℃培养过夜(12-16h)。

注意: 如使用的是DH5a、TOPO10等其他厂家的感受态细胞, 请按照厂家说明书进行转化操作。

## 阳性重组子的鉴定:

(1) 菌落PCR法:

1. 挑取大小中等的克隆菌至10 $\mu$ L无菌水中, 充分混合, 取2 $\mu$ L混合液作为PCR反应的模板。

2. 使用载体克隆位点两端的引物作为鉴定重组子的扩增引物。

3. PCR反应条件:

94℃	2 min	} 30 cycles (退火温度 $\approx$ 引物的TM值-5) (根据片段的大小确定延伸时间)
94℃	30 sec	
50-60℃	30 sec	
72℃	1 kb/min	
72℃	10 min	

4. 取10 $\mu$ L PCR产物电泳鉴定。

5. 确认重组子后, 将剩下的8 $\mu$ L混合液转接到LB培养基中(含相应抗生素), 过夜摇菌培养, 然后抽提质粒, 并测序。

(2) 限制性酶切法:

1. 挑取大小中等的克隆菌至LB培养基中(含相应抗生素), 过夜摇菌培养, 然后抽提质粒。

2. 用载体上的限制性内切酶进行酶切鉴定。

注: 试剂盒中提供的Linearized Control Cloning Vector, 克隆位点两边含有M13F/M13R, 且两边各含有一个XhoI, 因此可用引物M13F/M13R进行菌落PCR, 扩增出1625bp片段, 或用XhoI进行酶切鉴定, 可切出1512bp和2845bp片段。

## 重组子克隆菌少, 或阳性率低:

① 感受态效率低, 使用转化效率 $>5 \times 10^7$  cfu/ $\mu$ g的感受态细胞; ② 载体或片段加入量太少或太多, 按照推荐量加入;

③ 载体或片段纯度低, 重新酶切或PCR制备; ④ 载体或片段质量低, DNA受损伤, 如切胶时紫外照射时间长, 重新制备;

⑤ 转化后没做复苏, 可加入SOC/LB培养基, 振荡培养60min; ⑥ 克隆位点两端的序列含重复序列或GC含量高, 尽量避免此位点;

⑦ DNA片段与线性化载体之间的同源臂太短, 可以适当增加到25-50bp, 但不要超过80bp;

⑧ 克隆基因可能对宿主菌有毒性, 比如某些编码膜蛋白和DNA结合蛋白的基因, 某些启动子和调节序列基因, 或含有倒置或串联重复序列的基因。选用室温过夜培养平板, 或换用低拷贝质粒载体。

注意: 快速克隆步骤仅限使用随试剂盒提供的感受态细胞。