GV Seamless Cloning Kit

Cat #：GT1509-20T

产品规格：20T

保存与运输：-20℃。

本试剂盒利用同源重组的原理，将含有同源末端序列的 DNA 片段与载体相连，实现 DNA 片段的定向克隆。不依赖于内切酶和连接酶，不受限制性酶切位点的限制，2×Seamless Master Mix 中的重组酶可实现任意片段与任意载体的连接。通过合理的设计，可同时实现多个片段的定向克隆。

一、试剂盒组成

成分	规格
2×Seamless Master Mix	100μl
2.6kb Linearized Control Cloning Vector（30ng/ul）	10μl
542bp Control (20ng/μl)	10μl
M13F(-47) Sequencing Primer（10μM）	50μl
M13R(-48) Sequencing Primer（10μM）	50μl
Handbook	1

二、产品特点

1、不受限制性酶切位点的限制，实现任意片段与任意载体的连接。

2、可同时定向插入多个片段。

3、连接仅需 15 min。

4、优质 PCR 产物（无非特异性条带、无引物二聚体）可直接进行重组反应，无需纯化。

三、操作步骤

线性化载体的制备：

连接反应前载体需进行线性化处理，线性化不彻底会导致阴性假阳性克隆的产生，因此推荐使用双酶切或 PCR 扩增的方法制备线性化载体，酶切或扩增产物经胶回收获得高纯度的线性化载体。

建议使用高保真聚合酶扩增线性化载体。

DNA 片段的制备：

1、 DNA 片段可通过酶切或 PCR 扩增的方法获得。进行单片段连接时若 PCR 产物纯度高、无非特异性条带和引物二聚体，可直接进行重组反应，无需纯化。建议使用高保真聚合酶扩增 DNA 片段。

2、 引物设计原则：要求引物的 5’端包含一段与线性化载体末端同源的碱基序列（15-80 bp）；引物的 3’端包含一段与模板 DNA 结合的碱基序列。如下所示，在设计引物时，遵循同源序列与载体的 3’末端序列对齐的原则，从载体的 3’末端开始计算出 15-80bp 的长度作为同源序列，在选取的同源序列的基础上加上一段与 DNA 模板结合的碱基序列即组成整个引物序列。

举例：

目的基因：ATGACAAGTTCAGCGTGTCCGTAG--------CGACAACCACTACCTGAGCACTAG

线性化目的载体：GTA**AAACGACGGCCAGTGAATTC**---------待插入目的基因---------**-AAGCTTGGCGTAATCATGGT**CATA

引物序列：

F：**AAACGACGGCCAGTGAATTC**ATGACAAGTTCAGCGTGT

R：**ACCATGATTACGCCAAGCTT**CTAGTGCTCAGGTAGTGGT

加粗区域为载体同源序列，目的基因扩增引物上游含有与载体 18-30bp 的重复序列为佳。

克隆反应：

1、 室温下，按下表配制反应体系：

试剂	体积
DNA 片段和线性化载体	0.5-5 μl
2×Seamless Master Mix	5 μl
ddH_2O	x μl

连接反应体系的总体积为 10μl（用 ddH_2O 补足）。轻弹离心管将反应体系混匀，短暂离心 3-5s。

线性化载体建议添加 20-60 ng，DNA 片段按照与载体摩尔比 3:1 添加。

注：整个操作过程均在室温条件下进行，切勿在冰上操作。使用后请及时将试剂盒置于-20℃保存。

2、 将离心管置于 50℃条件下反应 15 min。反应结束后将离心管放置在冰上，进行后续的转化操作。

注：若连接产物未能立即用于转化，需保存于-20℃。若连接产物未能立即用于转化，需保存于-20℃。不建议对连接产物做长期保存。

3、 阳性对照实验：

取试剂盒提供的对照片段、线性化载体各 1μl 进行克隆、转化后，将菌液涂布在含有相应抗生素的培养平板上，37℃培养过夜。取菌斑进行 PCR 扩增。

转化（此操作需在无菌条件下进行）：

1、取 5 μl 连接产物加入到 50-100 μl 刚刚融化的 DH10B 感受态细胞中（感受态细胞应刚从-80℃取出，于冰上融化，刚刚融化便加入连接产物），温和混匀，冰浴 2-30 min。

2、42℃水浴热激 30s。（勿晃动离心管）

3、立即转移到冰上，静置 2 min（冰浴期间勿晃动离心管）。

4、加入 300-500 μl LB 培养基（不含抗生素），37℃，200-250 rpm 振荡培养 60 min。

注：当单个片段连高拷贝 AMP 载体，可省略复苏步骤（步骤 4），直接将转化后的菌液涂布在含相应抗生素的平板上，37℃培养过夜。

5、取 200 ul 菌液，涂布于含相应抗生素的平板上，37℃培养过夜。

注：若想获得更多克隆，可将菌液低速（3000 g）离心 2 min，弃掉部分上清液，用移液器吹打至菌体完全重悬，吸取全部菌液涂布于含相应抗生素的平板上，37℃培养过夜。

检测：

1、 菌落 PCR 法（无菌操作）：

（1）挑选单菌落至 10 μl 无菌水中，充分混匀。

（2）取 2 μl 菌液作为 PCR 反应的模板，采用载体克隆位点两端的引物作为鉴定重组子的扩增引物。阳性对照使用试剂盒提供的 M13F(-47)/M13R(-48)引物扩增。

（3）PCR 反应条件

94℃ 2 min

94℃ 30 sec

56℃ 30 sec } 30 cycles

72℃ 1 kb/min （根据片段大小确定延伸时间）

72℃ 10 min

（4）电泳检测 PCR 产物，试剂盒所提供阳性对照扩增产物为 646bp。

（5）确定重组子后将剩余的 8 μl 菌液转接到 LB 培养基中（含相应的抗生素），摇菌培养过夜，然后提取质粒进行测序。

2、 限制性酶切法：

（1）挑取单克隆至 LB 培养基中（含相应抗生素），过夜摇菌，抽提质粒。

（2）用合适的限制性内切酶，对质粒进行酶切，鉴定重组子。

测序：

确定重组子后将剩余的 8 μl 菌液转接到 LB 培养基中（含相应的抗生素），摇菌培养过夜，然后提取质粒进行测序。