Multi-DNA SeamLess Cloning Mix

货号规格

货号	*CL1031*
10-μl 反应数	*50 rxns*

产品简介

Multi-DNA SeamLess Cloning Mix 是一款高效的无缝克隆试剂盒，专为将单个或多个 *DNA* 片段无缝克隆至载体中而设计。该产品采用先进的无缝克隆技术，实现 *DNA* 片段的快速、精确组装，是高效克隆、多片段 *DNA* 组装和定向克隆的理想选择。与传统克隆方法需要经过多步操作（如限制酶切割和连接）不同，本试剂盒将所有步骤简化为一步反应，确保更快速和更可靠的克隆结果。本品含有高保真 *Taq DNA Ligase*，最快可于 *5* 分钟完成单片段重组，阳性率≥*95%*。

产品组成

Component	**CL1031**
Multi-DNA SeamLess Cloning Mix	*250 μl*
*pUC19 Control Plasmid **	*5 μl*
*500 bp Control Fragment **	*5 μl*

* *pUC19 Control Plasmid* 是阳性对照载体，线性化质粒，氨苄青霉素抗性，*40 ng/μl*。

* *500 bp Control Fragment* 是阳性对照插入片段，*500 bp*，*20 ng/μl*。

保存条件

-20℃。

应用范围

多片段 *DNA* 组装；快速克隆；定点突变构建。

产品特点

1. 高效的多片段克隆：支持单次反应组装最多 *5* 个 *DNA* 片段，适用于多片段 *DNA* 组装。

2. 快速简便：简化了克隆过程，减少了背景噪音，单片段克隆最快可在 *5* 分钟内完成。

3. 高保真度：采用 *HiFi Taq DNA* 连接酶，提升了克隆的准确性和成功率，即使对于较大或复杂的片段也能有效克隆。

实验步骤

1. 制备线性化载体

可以采用以下两种方法制备线性化载体：

方法 1：酶切制备线性化载体

使用限制性内切酶消化超螺旋质粒 *DNA*，通过单酶切或双酶切使载体线性化。

* 确保线性化载体不含未切割的环状质粒，以减少自连接背景。

* 建议通过双酶切使载体线性化，酶切后对内切酶进行失活处理。

* 通过切胶回收纯化载体时，建议通过长时间电泳使线性化质粒与环状质粒区分开，精准回收线性化质粒，可减少假阳性克隆。

方法 2：反向 PCR 扩增制备线性化载体

推荐使用预线性化质粒作为模板，以高保真 *PCR* 试剂进行扩增，以确保克隆的质量。

* *PCR* 产物有非特异性片段时，或进行多片段克隆时，建议将 *PCR* 产物纯化后使用。

2. 设计引物：用于插入片段的 PCR 扩增

引物设计原则：

PCR 引物的 *5′* 端必须包含与其相邻片段（插入片段或载体）末端同源的 *15~25 nt*（推荐 *18 nt*）序列。假如载体为粘性末端，且 *3′* 端突出，则引物设计必须包含突出部分；若 *5′* 端突出，则引物设计可以包含突出部分，也可以不包含。

插入片段正向引物序列：

5′—上游载体末端同源序列 + 酶切位点（可选）+ 基因特异性正向扩增序列— *3′*

插入片段反向引物序列：

3′—基因特异性反向扩增序列 + 酶切位点（可选）+ 下游载体末端同源序列—*5′*

* 包含多个重复序列的片段无法采用无缝克隆的策略进行连接，选择无重复序列且 *GC* 含量尽量均匀的区域进行克隆。当载体克隆位点上下游 *25 nt* 区域内 *GC* 含量为 *40%~60%* 时，重组效率最高；

* 当重组转化子产物>*10 kb* 以上时，推荐按 *20~25 bp* 同源臂设计引物。

3. 制备 DNA 片段

建议使用高保真 *PCR* 试剂扩增目标 *DNA* 片段，以减少突变的产生。通过琼脂糖凝胶电泳对产物进行检测，纯化回收特异性 *DNA* 片段后进行重组反应。若无非特异性扩增，则 *DNA* 产物可直接用于重组反应，但加样体积不应超过反应总体积的 *20%*。

4. 重组反应

4.1 于冰水浴中配制以下反应体系：

Component	Amount	Negative control [3]	Positive control [4]
Multi-DNA SeamLess Cloning Mix	*5 μl*	*5 μl*	*5 μl*
Linearized vector [1]	*50-200 ng*	*50-100 ng*	*pUC19 Control Plasmid, 1 μl*
Insert fragment [2]	*10-200 ng*	-	*500 bp Control Fragment, 1 μl*
ddH_2O	*To 10 μl*		

[1] 最适载体用量 *(ng) = 0.02* × 载体碱基对数。

[2] 插入单片段，最适片段用量（*ng*）*=0.04* × 片段碱基对数；插入多片段，每片段最适用量（ *ng*）*= 0.02* × 片段碱基对数。

[3] 推荐设置阴性对照，可用来确认线性化载体中是否有环状质粒残留。

[4] 必要时可以设置阳性对照，可用来排除其它实验材料及操作因素的影响。

[5] 其他注意事项：若插入单片段的长度大于载体，则应互换载体与插入片段用量；若插入片段的长度小于 *200 bp*，则插入片段应使用 *5* 倍载体用量；若按上述公式计算得到的用量超过最低 / 最高值，则建议直接按最低 / 最高用量使用；载体片段过长、插入片段过长或片段数过多，克隆菌落数及阳性率均会降低；单点突变按照最适载体用量加入体系，多点突变按照多片段每片段最适用量加入体系。

4.2 用移液器轻轻吹打混匀反应液，避免产生气泡。勿涡旋混匀。

4.3 将反应液置于 *PCR* 仪中，设置反应温度为 *50°C*，反应时间 *5-60 min*，根据插入片段数量进行设置：

温度	推荐时间	
50°C	插入片段 *1-2* 个	插入片段 *3-5* 个
	15 min	*30 min*

* 当载体骨架*>10 kb* 或插入片段*>4 kb* 时，建议延长反应时间到 *30-60 min*。

4.4 反应完成后，瞬时离心将反应液收集至管底。

4.5 将反应液置于冰上冷却后进行转化，或置于*-20*℃保存。

* *-20*℃储存的重组产物，建议在 *1* 周内使用。

5. 重组产物转化

5.1 取 *5~10 μl* 重组产物加入到 *100 μl* 感受态细胞中，缓慢吸打混匀，冰上放置 *30 min*。

5.2 42℃热激 *60 sec*，冰浴 *5 min*。

5.3 加 *500 μl SOC* 或 *LB* 培养基，*37*℃ 振荡培养 *50-60 min (200 rpm)*。

5.4 将培养后的菌液均匀涂布在含有对应抗生素的平板上，*37*℃倒置培养过夜。

* 建议使用转化效率 *> 10^8 CFU/μg* 的感受态细胞。

6. 阳性克隆鉴定

菌落 *PCR* 法：挑取单菌落至 *10 μl ddH_2O* 中混匀，*95*℃裂解 *10 min* 后，取 *1 μl* 裂解液作为模板，进行菌落 *PCR* 鉴定。

酶切检测法：将单菌落接种至对应抗性的培养基中培养过夜后，提取质粒进行酶切鉴定。

阳性对照的阳性克隆检测：菌落 *PCR* 引物使用通用引物 *M13F* 与 *M13R*，酶切鉴定用限制性内切酶 *HindIII* 与 *EcoRI*。

* 菌落 *PCR* 时建议至少使用一条通用引物，避免假阳性结果。

* 可进一步对阳性克隆进行测序鉴定。

* *M13F*：*TGTAAAACGACGGCCAGT*；*M13R*：*CAGGAAACAGCTATGAC*。

常见问题

1. 转化效率低

可能的原因：感受态细胞的转化效率低；*DNA* 片段比例不合适；*DNA* 片段纯度不佳；重组产物用量过多。

2. 大量克隆不含插入片段

可能的原因：载体线性化不完全；相同抗性质粒污染；平板培养基抗性不足。

3. 大量克隆含有不正确的插入片段

可能的原因：插入片段含有非特异性 *PCR* 扩增产物；插入片段含有多个重复序列。

本品仅供科学研究使用。