

天
净
沙
系
列

CAT#:221024-20
低温运输, -20℃保存

BINGENE

无缝克隆试剂盒

Seamless Cloning and Assembly Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	无缝克隆是一种简单、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。反应及转化时间短，阳性率达 95%以上。此反应的示意图如下： 本产品特点总结如下： 1. 简单、高效地定向克隆 DNA 片段。 2. 可同时定向克隆两个或多个 DNA 片段。 3. 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。 4. 省时，反应时间加转化时间短至 20 分钟。 5. 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。 6. 本产品足够 20 次 20uL 体系的无缝克隆。 7. 本产品只能用于科研。																
规格及成分	本产品使用塑料袋包装 <table><tr><th>成份</th><th>编号</th><th>规格</th><th>包装材料</th></tr><tr><td>2×无缝克隆 Mix</td><td>A221024a</td><td>200 uL</td><td>0.5mL 红盖管</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>A210806</td><td>1 mL</td><td>1.5mL 蓝盖管</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>A221024sc</td><td>1 份</td><td>无</td></tr></table>	成份	编号	规格	包装材料	2×无缝克隆 Mix	A221024a	200 uL	0.5mL 红盖管	超纯水	A210806	1 mL	1.5mL 蓝盖管	使用手册	A221024sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料														
2×无缝克隆 Mix	A221024a	200 uL	0.5mL 红盖管														
超纯水	A210806	1 mL	1.5mL 蓝盖管														
使用手册	A221024sc	1 份	无														
运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期一年。																
自备试剂	线性化载体、DNA 片段、感受态细胞、SOC 或 LB 培养基和培养皿（含抗菌素和不含的）																
使用方法	一、线性化载体的制备： 可通过单酶切、双酶切或 PCR 扩增的方法来制备。（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。） 二、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 3' 端必须包含 18-50 个能与模板 DNA 结合的碱基序列，以便 PCR 扩增出目的 DNA 片段。引物的 5' 端必须包含 15-80 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。 三、重组反应： 3. 按照如下体系操作： <table><tr><td>线性化载体</td><td>50-100 ng</td></tr><tr><td>自备的 DNA 插入片段</td><td>X ng</td></tr><tr><td>2×无缝克隆 Mix</td><td>10 uL</td></tr><tr><td>超纯水</td><td>补足至总体积为 20 uL</td></tr><tr><td colspan="2">注意：目的片段与载体的摩尔比建议在 2:1-3:1 之间。 当插入片段总和>5 kb 的时候，可适当延长孵育时间到 30-50 min。</td></tr></table> 4. 50℃反应 15 分钟，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。 四、转化： 5. 取 5 uL 连接液至 50-100 uL 刚刚融化的感受态细胞中，轻轻混匀，冰浴 2-30 分钟。 6. 42℃水浴热激 30 秒。 7. 立即放置于冰上静置 2 分钟。 8. 加入 300-500 uL 无菌 SOC 或 LB 培养基（不含抗生素），37℃，200-250 rpm 振荡培养 60 分钟。 9. 吸取 200 uL 菌液涂板，为得到更多克隆，可先 3000 g 离心 2 分钟，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（12-16 小时）。 10. 用菌落 PCR、直接测序或其他方法鉴定重组子。	线性化载体	50-100 ng	自备的 DNA 插入片段	X ng	2×无缝克隆 Mix	10 uL	超纯水	补足至总体积为 20 uL	注意：目的片段与载体的摩尔比建议在 2:1-3:1 之间。 当插入片段总和>5 kb 的时候，可适当延长孵育时间到 30-50 min。	
线性化载体	50-100 ng										
自备的 DNA 插入片段	X ng										
2×无缝克隆 Mix	10 uL										
超纯水	补足至总体积为 20 uL										
注意：目的片段与载体的摩尔比建议在 2:1-3:1 之间。 当插入片段总和>5 kb 的时候，可适当延长孵育时间到 30-50 min。											
关联产品	感受态细胞										