



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2018-11-09

SE无缝克隆和组装试剂盒 [含零背景ZT4-Blunt(Amp+)载体] SE Seamless Cloning and Assembly Kit

(目录号: ZC232)

试剂盒组成	ZC232-1 20次	ZC232-2 60次
5×SE Cloning Buffer	40μl	120μl
SE Recombinase	20μl	60μl
ZT4-blunt载体	20μl	60μl

保存: -20°C至少保存1年。

■ 产品简介

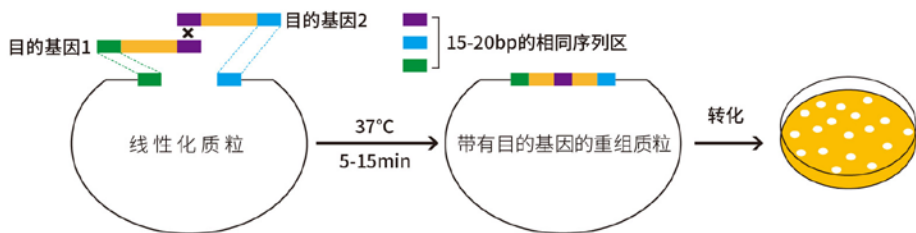
本产品利用高效重组酶和同源重组原理, 只需DNA插入片段末端与载体末端具有15--20个同源碱基序列, 就可以在载体的任意位点完成目的片段与载体的克隆重组。可实现1-5个片段的高效无缝拼接; 该试剂盒采用非连接酶克隆体系, 可极大地降低载体的自连, 保证产品克隆阳性率在90%以上。另外产品提供已经线性化的即用载体ZT4-BLUNT, 本载体为含有自杀基因的新一代载体。

■ 产品特点

1. 即用: 产品提供即用载体。
2. 快速简便: 5-30分钟完成载体构建。
3. 精确: 不会增加任何额外的序列。
4. 效率高: 高达90%阳性克隆率。

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.



■ 操作步骤

A. 载体制备--线性化处理

本试剂盒含有我公司已经制备好的线性化的ZT4-BLUNT载体。载体详细信息参考附录。您也可以使用自制的载体，具体制备方法参看ZC231无缝克隆试剂盒。

B. 目的插入片段制备（所有DNA聚合酶都可，但要求高保真时，推荐pfu酶类。）

设计引物进行目的片段的PCR扩增，引物设计要保证目的片段两端有至少15bp序列与线性化载体的两端一致，以便于重组反应的进行。PCR每条引物长度至少在33-40bp，包括5'端与载体同源的15bp以及目的片段特异性序列18--25bp。产物尽可能纯化后使用；不纯化时，需要考虑模板污染，杂片段污染，通常10ul体系最多加入2ul不纯化的PCR产物。

ZT4-BLUNT载体两端30个碱基序列如下：

- ① 5' TTCGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGAT 3'
- ② 5' AGAATATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGAT 3'

引物设计举例：（这里选择同源序列长度为18bp）

特异的正向(反向)引物仅需按照正常引物设计方法设计，此后在序列前加上同源序列(15-30bp)。

正向插入进载体：正向引物5' CGAGTTTTTCAGCAAGAT-特异的正向引物 3'

反向引物5' GAGATCTTCTAGAAAGAT-特异的反向引物 3'

反向插入进载体：正向引物5' CGAGTTTTTCAGCAAGAT-特异的反向引物 3'

反向引物5' GAGATCTTCTAGAAAGAT-特异的正向引物 3'

注：通常计算扩增引物退火温度时，只需计算基因特异性扩增序列的Tm值，末端同源序列不应参与计算，为了得到高效率克隆，建议Tm≥48°C。

C. 重组反应

1. 反应体系: 5×SE Cloning Buffer 2 μl

线性化载体ZT4-Blunt 1 μl

(载体用量: 3kb以下建议20ng, 6kb推荐40ng, 9kb 推荐60ng。)

插入片段 1 Y1 μl (X:Y1摩尔比=1:2~1:5)

插入片段 2 Y2 μl (X:Y1摩尔比=1:2~1:5)

SE Recombinase 1 μl

总体积 10 μl (加ddH₂O 补足到10μl)

2. 混匀后在37°C水浴锅或PCR仪中放置5-30分钟, 然后转移到冰上或-20 °C保存。

3. 进行感受态细胞转化实验。

注意事项:

1. 重组反应后的产物不可长时间室温放置, 推荐-20°C保存或化冻后冰上放置备用。

(通常反应产物室温放置半小时无问题。)

2. 试剂盒连接效率较高, 感受态转化效率 $>10^7$ Cfu/μg DNA,即可得到很好的实验效果。大片段和多片段应该使用 10^8 Cfu/μg DNA高效感受态, 且转化子生长慢1-4小时。

3. 推荐插入片段用量与反应时间 (插入片段不包含同源序列长度)

a. 15-50bp (引物合成的) 1μM浓度下加入2ul 重组反应时间推荐 37°C 15min

b. 50-600bp (PCR片段) 20ng 重组反应时间推荐 37°C 15min

c. 600-5kb 摩尔比1:2 (载体: 插入片段) 重组反应时间推荐 37°C 15min

d. 大于5kb 建议200ng 重组反应时间推荐 37°C 5-10min

e. 多片段先确定载体用量后, 再确定插入片段用量, 建议1kb以下片段 20ng-200ng, 1kb以上片段50ng-300ng。 重组反应时间推荐 37°C 15-30min, 3片段以上连接必须30min连接。

f. 引物合成的15bp-50bp小片段连接具体步骤和我们公司做过的连接经验数据可查阅公司官网相关说明或者来电来信向我们咨询索取。



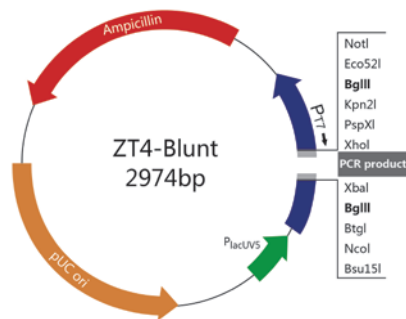
D. 转化 (推荐方案)

1. 从-80°C取出一支含有100μl的感受态细胞的EP管，冰上溶化。将5μl反应液加入至100μl感受态细胞中，冰上继续放置10-30分钟^①。
2. 42°C水浴1分钟，然后返回冰上放置2分钟。
3. 加入400μl不含抗生素的LB或SOC，37°C震荡培养20-60分钟^②左右。
4. 取100-200μl感受态细胞均匀铺在含有抗生素的LB板子上，37°C温箱过夜。第二天，挑3--5个克隆进行检验。

备注: ①使用 $>10^8$ Cfu/μg DNA高效感受态时，对于小于5kb的单片段转化5-10min即可；

②对于小于5kb的单片段复苏20min即可（仅限氨苄，其他抗性建议45min以上。）

■ ZT4-Blunt载体图谱



■ ZT4-Blunt载体测序引物序列

T7 Forward Sequencing Primer, 20-mer:
5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'

RSP Reverse Sequencing Primer, 24-mer:
5' -AAGACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

■ ZT4-Blunt载体多克隆位点序列

T7 forward sequencing primer, 20-mer										Eco52I		NotI		BglII		Kpn2I		XhoI															
5' GGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG										AGA	GCG	GCC	GCC	AGA	TCT	TCC	GGA	TGG	CTC	GAG	TTT	TTC	AGC	AAG									
3' CCG CAT TAT GCT GAG TGA TAT CCC										TCT	CGC	CGG	CGG	TCT	AGA	AGG	CCT	ACC	GAG	CTC	AAA	AAG	TCG	TTC									
AT										XbaI		BglII		BtgI		NcoI		Bsu15I															
TA										PCR product		A	TCT	TTC	TAG	AAG	ATC	TCC	TAC	AAT	ATT	CTC	AGC	TGC	CAT	GGA	AAA	TCG	ATG	TTC	TTC	T	3'
										T	AGA	AAG	ATC	TTC	TAG	AGG	ATG	TTA	TAA	GAG	TCG	ACG	GTA	CCT	TTT	AGC	TAC	AAG	AAG	A	5'		
																				RSP reverse sequencing primer, 24-mer													