



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号:2018-12-20

# SE无缝克隆和组装试剂盒

## SE Seamless Cloning and Assembly Kit

(目录号: ZC231)

试剂盒组成	ZC231-1 20次	ZC231-2 60次
5×SE Cloning Buffer	40μl	120μl
SE Recombinase	20μl	60μl

保存: -20°C至少保存1年。

### ■ 产品简介

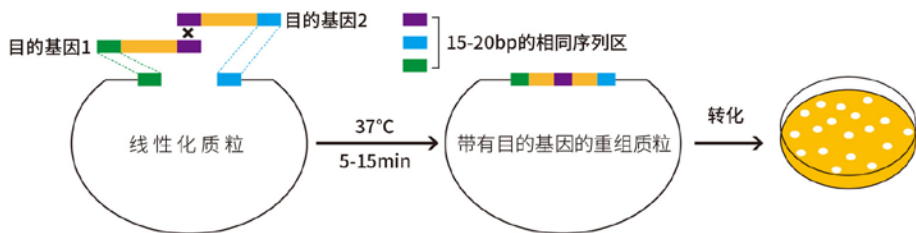
本产品利用高效重组酶和同源重组原理, 只需DNA插入片段末端与载体末端具有15--20个同源碱基序列, 就可以在载体的任意位点完成目的片段与载体的克隆重组。可实现1-5个片段的高效无缝拼接; 该试剂盒采用非连接酶克隆体系, 可极大地降低载体的自连, 保证产品克隆阳性率在90%以上。

### ■ 产品特点

1. 灵活: 克隆位点可在载体的任意位置。
2. 精确: 不会增加任何额外的序列。
3. 快速: 5-30分钟完成载体构建。
4. 高效: 90%阳性克隆率, 1kb以下DNA片段浓度低至1ng, 阳性率仍可达90%以上。
5. 连接范围大: 可连接15bp-12kb DNA片段。小片段连接尤其适宜RNA干扰、基因编辑等质粒构建实验。

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

1. 酶切法：选取合适的位点，单酶切或双酶切皆可，但是单酶切容易导致载体自连，载体线性化不彻底容易导致假阳性的产生。为了降低自连背景，提高阳性率，建议采用双酶切，并对酶切后的载体进行胶回收。

**注：**无缝克隆反应体系内无双链DNA连接酶，不会发生载体自连反应。因此，即使是以单酶切方式制备的线性化载体也无需进行末端脱磷酸处理。重组产物转化后出现的假阳性克隆(无插入片段)是由酶切不完全未线性化环状载体转化而形成的。我们推荐酶切后胶回收可以把这种未线性化载体比例降低到最低程度。

2. PCR法：选取合适的位点，设计正反向引物，建议采用高保真DNA聚合酶扩增。

**注：**以质粒为模板的PCR来源线性载体（PCR产物）纯化前用Dpn I内切酶消化质粒模板，可以降低背景，提高阳性率。但是一般情况下，经过胶回收已经足以把这种未线性化载体比例降低到最低，因此PCR来源的线性化载体我们也推荐胶回收。

### 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10μl体系最多加入2μl不纯化的PCR产物。（引物设计详见附件）

**引物设计原则：**5'粘末端会被SE重组酶切成平末端，3'粘末端保留。因此，同源序列应该以3'末端为准。

### C. 重组反应

1. 反应体系:	5×SE Cloning Buffer	2 μl
	线性化载体 推荐10-50ng	X 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ddH <sub>2</sub> O 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)

- 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
- 50-600bp (PCR片段) 20ng 重组反应时间推荐 37°C 15min
- 600-5kb 摩尔比1:2 (载体: 插入片段) 重组反应时间推荐 37°C 15min
- 大于5kb 建议200ng 重组反应时间推荐 37°C 5-10min
- 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。
- 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<sup>①</sup>。
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<sup>②</sup>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。

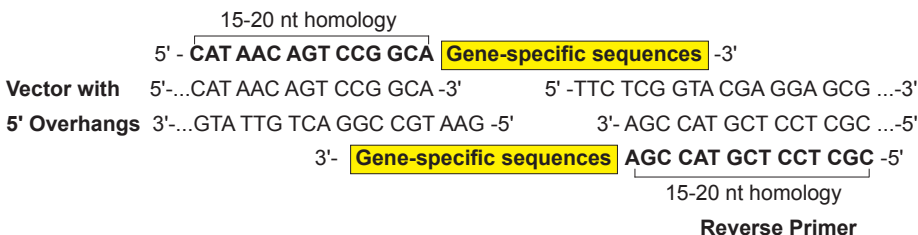
**备注:** ①使用 $>10^8$ Cfu/μg DNA高效感受态时，对于小于5kb的单片段转化5-10min即可；

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。）

#### 附录：(PCR引物设计示例)

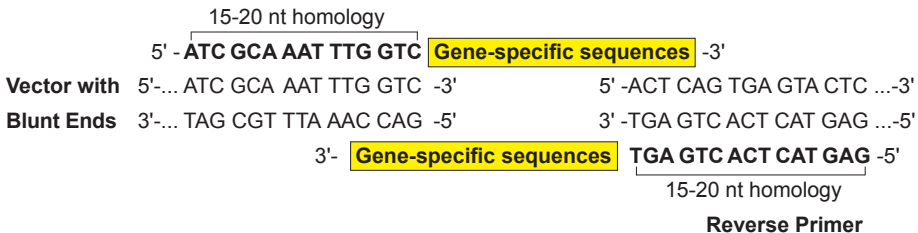
##### Forward Primer

##### 5'粘性末端引物设计



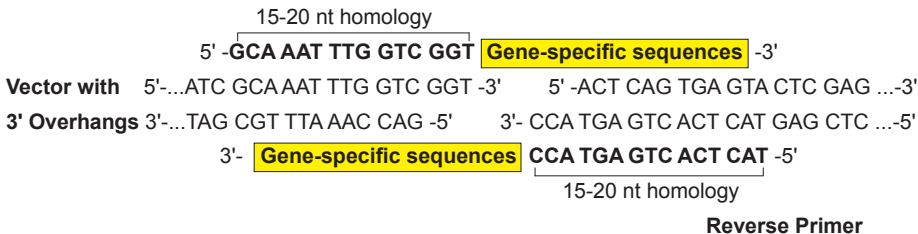
##### Forward Primer

##### 平末端引物设计



##### Forward Primer

##### 3'粘性末端引物设计



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T<sub>m</sub>值，末端同源序列不应参与计算，为了得到高效率克隆，建议T<sub>m</sub>≥48°C。