



GENECARER 官方微信，专注于细胞基因编辑和病毒包装：

- Website www.genecarer.com
- Service hotline 029-84613682

【常见问题】

问题描述	原因	解决方案
转化效率低	感受态效率低下	使用新制备或经验证的高效率感受态。
	DNA片段纯度不够	对载体和插入片段进行胶回收纯化。
	重组反应抑制物	由于EDTA等金属离子螯合剂会抑制重组反应，因此纯化产物应溶解于无菌去离子水中，切勿使用Tris-EDTA等缓冲液。
克隆阳性率低	DNA片段比例不佳	按照说明书推荐的最适用量和比例配制反应体系。若线性化载体和插入片段已经过纯化，且电泳检测条带单一或无Smear残留时，可使用NanoDrop等超微量核酸测定仪进行测定，只有当A260/A280在1.8~2.0之间时浓度值可信。
	载体线性化不完全	酶切制备线性化载体时，增加限制性内切酶用量，延长酶切时间，使用胶回收纯化酶切产物。
	相同抗性质粒污染	以质粒为模板进行插入片段PCR扩增时，应使用已经线性化的质粒作为模板，使用DpnI对扩增产物进行酶切。或对PCR产物进行胶回收纯化，在胶回收电泳过程中，应使用新鲜的电泳缓冲液分离DNA片段，从而防止杂质污染。
大量克隆含有不正确的插入片段	平板抗性不足	使用新鲜制备的抗生素平板。
大量克隆含有不正确的插入片段	非特异性PCR扩增产物	优化PCR体系，提高扩增产物特异性，或对PCR产物进行胶回收。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。

GeneCarer Seamless Cloning and Assembly Kit

货号：A101

保存：-20°C

运输：2-8°C

货号	规格
A101-01	50 µl
A101-02	100 µl
A101-03	250 µl

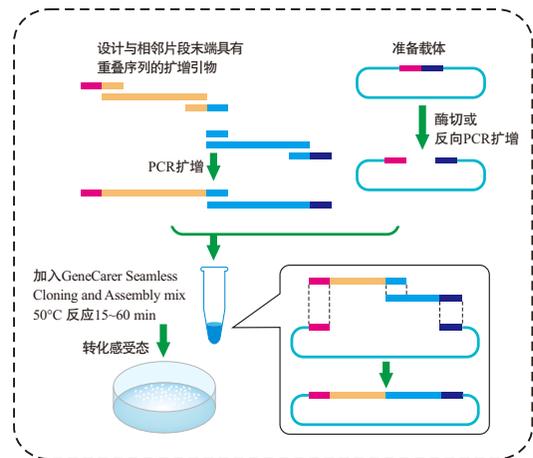
【产品概述】

基于重组原理的无缝克隆技术，作为新一代的克隆方法，不依赖于繁琐的酶切、回收、连接等操作，通过DNA片段与线性化载体末端的15~25 nt同源序列的重组，可将DNA片段克隆至任意线性化载体任意位点，载体自连背景极低。无缝克隆技术是一种简单、快速、高效的DNA定向克隆技术。GeneCarer Seamless Cloning and Assembly Kit 作为升级版的无缝克隆及多片段重组试剂盒，一个反应可实现两个或多个DNA片段的重组，且阳性率高于95%。

【适用范围】

基因定向克隆，多片段重组。

【实验流程图】



GeneCarer Seamless Cloning and Assembly试剂盒实验方案

1. 线性化载体制备

采用酶切或反向PCR扩增方法将载体线性化。

a. 酶切制备：

选择合适的位点，单酶切或双酶切皆可。若使用单酶切进行线性化，可以适当延长酶切时间以减少环状质粒残留。酶切完成后，应将限制性内切酶失活或对线性化载体纯化后再用于重组反应。

注1：载体酶切一定要完全，否则未切开的载体会影响后续阳性克隆的鉴定；

注2：经双酶切进行线性化无需去磷酸化，经单酶切则需要去磷酸化。

b. 反向PCR扩增制备

为减少扩增突变的引入，推荐使用高保真的聚合酶进行扩增。推荐使用线性化质粒做模板，以减少环状质粒模板残留对后续阳性克隆的鉴定。

注：如果使用环状质粒做模板，应使用DpnI对环状质粒进行降解，再用于后续重组反应。

2. 插入片段PCR引物设计

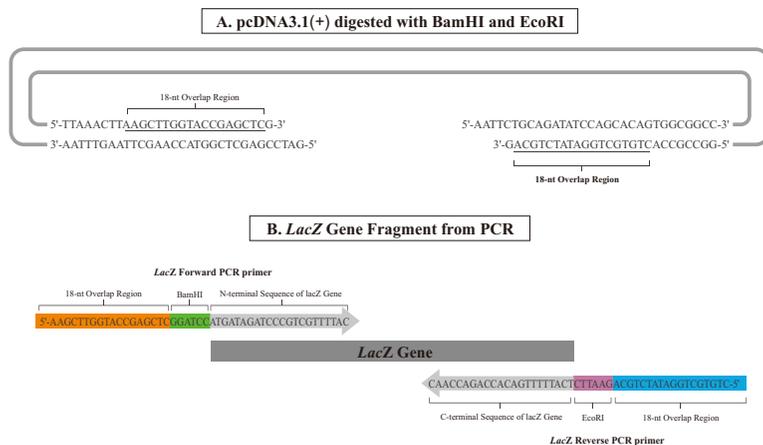
PCR引物的5'端必须包含与其相邻片段（其他插入片段或载体）末端同源的15~25 nt（推荐使用20 nt）序列。

插入片段正向扩增引物：

5'-载体上游末端同源序列+酶切位点（可选）+基因特异性正向配对序列-3'

插入片段反向扩增引物：

3'-基因特异性反向配对序列+酶切位点（可选）+载体下游末端同源序列-5'



注：尽量选择无重复序列且GC含量均匀的区域进行克隆，当酶切位点25 nt区域内含量为40~60%时，重组效率最高。

3. 插入片段PCR扩增

推荐使用高保真的聚合酶进行扩增，以减少扩增突变的引入。建议使用纯化后的PCR产物进行重组反应。若PCR产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定为特异性扩增产物，可直接使用，但加样体积应不超过总反应体积的20%。

4. 重组反应

a. 配制以下反应体系：

组分	反应体系
GeneCarer Seamless Cloning and Assembly Kit	5 μl
线性化载体	50~200 ng
插入片段	10~200 ng
Sterilized ddH ₂ O	补足至10 μl

重组反应体系配制完成后，用移液枪轻轻吹打混匀各组分后进行瞬时离心，避免气泡产生，切勿涡旋。

注1：插入片段与载体在重组时为相同摩尔数；

注2：若插入片段的长度小于200 bp，则插入片段与载体的摩尔比应调整为5:1；

注3：当1~2个DNA片段插入载体时，DNA总量推荐为0.02~0.5 pmols；当4~6个DNA片段插入载体时，DNA总量推荐为0.2~1 pmols；

注4：DNA摩尔数与质量换算公式：pmols=(weight in ng)×1000/(base pairs×650 daltons)；例如，200 ng的5000 bp载体为0.06 pmols；

注5：载体片段过长、插入片段过长或片段数过多，克隆数及阳性克隆率均会降低。

b. 将反应体系置于50°C，反应15~60 min。

注1：推荐使用PCR仪等温控比较精确的仪器进行反应，反应时间不足或过长均会影响克隆效率；

注2：插入片段小于500 bp时，推荐反应时间为15 min；

注3：插入片段在4 kb以上时，建议反应时间为45~60 min；

注4：插入3~5个片段时，推荐反应时间为45~60 min。

c. 重组反应完成后，将反应体系进行瞬时离心，置于冰上冷却，用于转化或者冻存于-20°C备用。

注：-20°C冻存的重组产物，建议在1周内使用。

5. 重组产物转化

取5~10 μl重组产物，加入到100 μl感受态细胞中，缓慢吹打混匀，冰上放置30 min。42°C热激90 sec，冰上放置3 min，加800 μl SOC或LB培养基，37°C振荡培养45~60 min。将菌液均匀涂布在含有对应抗生素的平板上，倒置于37°C过夜培养。

注：不同感受态细胞最后的克隆数及克隆阳性率有所差别，推荐使用转化效率大于10⁸ CFU/μg的感受态细胞。