

产品概述

2×Seamless Cloning Premix 是我公司开发的一款简单、快速、高效的通用型无缝克隆产品,可将插入片段快速定向克隆至任意载体的任意位点,在保证克隆数多和阳性率高的同时,一次可实现多至 5 个插入片段的同源重组。2×Seamless Cloning Premix 可应用于快速克隆、高通量克隆、无缝克隆和 DNA 定点突变等领域。

规格

规格	货号
20T	BR1C101-01
40T	BR1C101-02

试剂组成

1. 2×Seamless Cloning Premix

*本试剂已含有反应缓冲液、酶等成分。

保存条件

-20℃保存,使用前应混匀,避免反复冻融。

质量控制

1. 无外源核酸酶活性,无外源内切、外切核酸酶污染。

反应体系配制

Component	Volume per Reaction
2×Seamless Cloning Premix	5 μL
Linearized Vector	X μL
Insert Fragment	Y μL
ddH ₂ O	To 10μL

反应条件

单片段组装: 50℃, 15~30 min; 2 片段及以上组装: 50℃, 30~60 min。

*反应结束后置于冰上,立即转化。若不能及时转化,可置于-20℃保存。

技术说明

1. 组装前需要将载体和插入片段线性化,线性化方式可选择酶切或 PCR 扩增,并在载体和插入片段两端设置一段同源序列(15~25 bp),使得载体和插入片段 5' 和 3' 端带有相同的同源序列。同源区域内 GC 含量可控制在 40~60%。
2. 通常调整所有 DNA 片段摩尔数比例为 1: 1。当 1 或 2 个插入片段进行组装时, DNA 片段摩尔总数为 0.02~0.5 pmol, 当 3~5 个插入片段进行组装时, DNA 摩尔总数为 0.2~1.0 pmol。组装效率随着片段数量或长度的增加而降低。
3. 摩尔数计算可参考下列公式: $\text{pmols} = \frac{\text{质量 ng}}{(\text{片段长度 bp} \times 0.65 \text{ kDa})}$, 50ng 的 5000bp 的 dsDNA 摩尔数为 $50 / (5000 \times 0.65) = 0.015 \text{ pmol}$ 。
4. 为确保加样的准确性,在配置同源重组反应体系前可将线性化载体和插入片段适当稀释,各组分加样量不低于 1 μL。