

## GBclonart无缝克隆试剂盒

GBclonart 无缝克隆试剂盒提供了一种新颖、高效、快速的基因克隆方法，该技术不依赖于连接酶，不受载体和目的片段的酶切位点限制，而直接利用同源重组的方法，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。

编号	名称	规格
GB2001-24	GBclonart无缝克隆试剂盒	24 Rxns
GB2001-48	GBclonart无缝克隆试剂盒	48 Rxns

产品保存：此试剂盒可在-20℃或-80℃长期保存，使用时请避免反复冻融。

### 产品特点：

1. 灵活的克隆位点：任何载体的任意位置。
2. 快速简便：30min完成载体构建。
3. 精确：不会增加任何额外的程序。
4. 效率高：高达90%阳性克隆率。

### 适用范围：

载体DNA片段克隆	载体DNA转移	蛋白质表达
应用合成生物学	代谢工程	高通量克隆

### 操作流程：

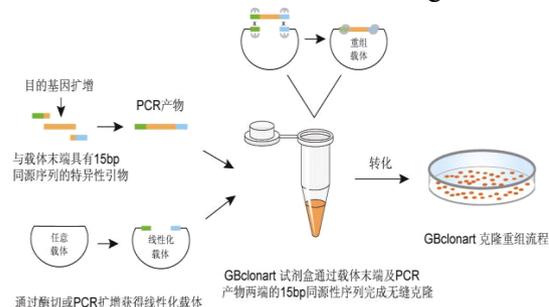
#### A. 载体制备—线性化处理

##### 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，而且对酶切后的载体进行割胶纯化。

##### 2. PCR法

选取合适的位点，设计正向和反向引物，一般载体长度均大于3kb，建议采用高保真的DNA聚合酶扩增。为了避免模板质粒DNA对后续试验的影响，建议对PCR扩增后的线性化载体进行割胶纯化，去除环状模板质粒，提高阳性率。



### B. 目的插入片段制备

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便于重组反应的进行。PCR每条引物长度至少在35-40bp，包括5'端与载体同源的15bp以及目的片段特异性序列20-25bp（注意：如果是表达载体克隆构建，设计引物时，应注意检查读码框的正确性）。引物的质量对克隆成功率有很大影响，请使用HPLC或PAGE纯化的引物。尽可能选用Pfu等高保真酶，同时建议对PCR产物进行割胶纯化。

### C. 重组反应

1. 将目的DNA片段和线性化载体以适当摩尔比加到试管中进行反应，载体的用量为50-100ng（注意：目的片段与载体的摩尔比在2:1-3:1之间为最佳，摩尔比过高或过低均会降低载体与目的片段的重组效率，反应时间30 min，时间过长或过短均不利于重组反应）。反应体系如下：

GBclonart反应液	15 μl
线性化载体	x μl
PCR片段	x μl
H <sub>2</sub> O	x μl
总体积	20 μl

2. 混匀后在45 °C孵育30min，然后转移到冰上。

3. 立即进行转化，剩余连接液可保存在-20 °C待用。

### D. 转化

使用5 μl反应液转化到100 μl感受态细胞中，建议使用的感受态细胞效率≥5×10<sup>7</sup>cfu/μg。

