



无缝克隆试剂盒使用说明

产品名称	Cat. No.	规格	组分
无缝克隆试剂盒	VGA-0002-0020	20 T	1 tube of 5 × Cloning Enzyme Premix
	VGA-0002-0050	50 T	1 tube of 5 × Cloning Enzyme Premix

产品信息

产品概述

本产品利用特殊的重组原理，不依赖于连接酶，可实现简单、快速、高效的 DNA 定向克隆。载体可通过任意方法线性化，然后与两端含有 15~25 bp 载体同源区域的 PCR 片段重组，反应时间短，重组效率高达 95% 以上。

产品组分

名称	组分	产品编号/规格	
		VGA-0002-0020 (20T)	VGA-0002-0050 (50T)
	5 × Cloning Enzyme Premix	80 μL	200 μL
	500 bp Control Insert (25 ng/μL)	5 μL	5 μL
	pUC 19 Control Vector, linearized (50 ng/μL)	5 μL	5 μL

产品应用

基因克隆、点突变

产品优势

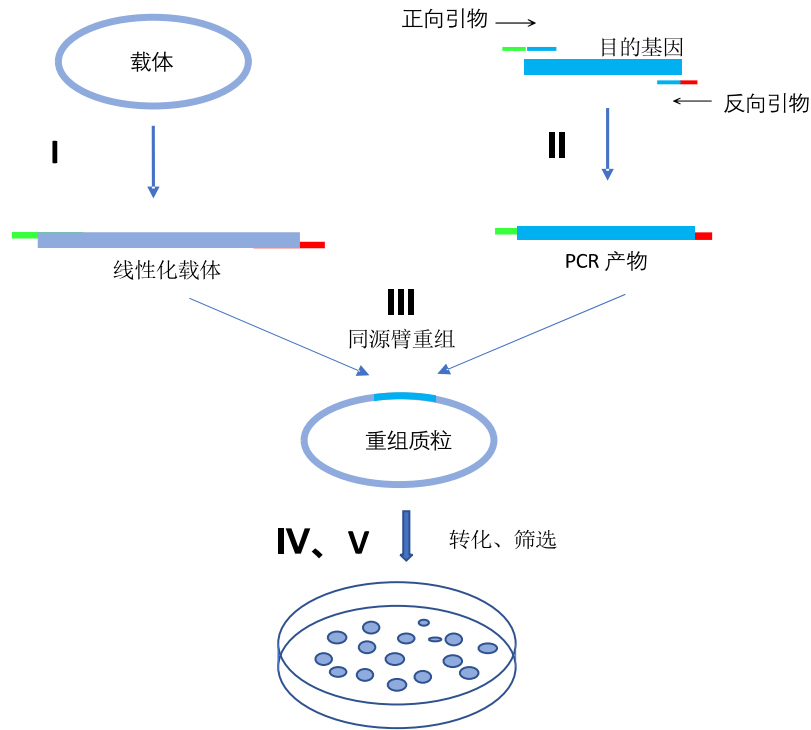
- 可插入任意载体的任意位置
- 一步，简单，准确，快速地进行多片段定向克隆，反应仅需 30 min，效率高达 95%
- 不依赖于连接酶，PCR 产物无需酶切，无需磷酸化
- 无缝连接，不引入额外序列

产品运输及存储

冰袋运输。-20°C 保存，有效期 1 年。



克隆实验流程图



克隆实验操作

I: 载体线性化

通过酶切获得线性化载体，平末端或者粘末端均可，双酶切更有利于降低背景；也可利用反向 PCR 扩增获得，高保真 DNA 聚合酶可避免产生不必要的突变。

II: 目的片段制备

1) 引物设计

目的片段扩增所需的正反向引物除含有与基因两端匹配的特异性序列外，均需含有与载体末端同源的 15~25bp 重叠序列，即：

PCR Forward Primer = 载体正向 overlap 序列(15~25bp) + 目的片段正向特异性序列

PCR Reverse Primer = 载体反向 overlap 序列(15~25bp) + 目的片段反向特异性序列

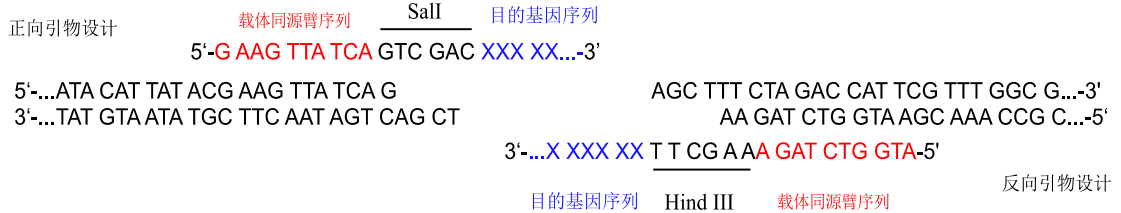




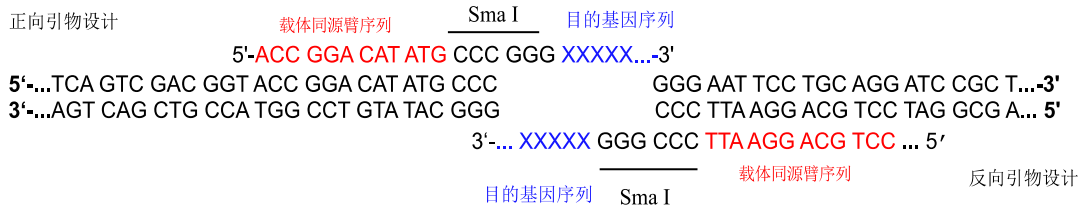
若要克隆多个目的片段，片段间引物设计原理与上相同。

根据载体所用限制性内切酶切产生的不同末端，引物设计所需要的同源臂序列如下：

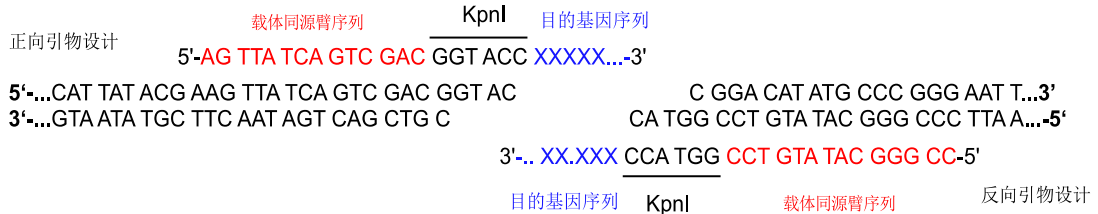
5' 粘末端



平末端



3' 粘末端



2) 用高保真 DNA 聚合酶扩增插入片段

III: 连接反应体系建立

组份	体积
5 × Cloning Enzyme Premix	4 μL
Linearized vector	10~100 ng
Inserts	X μL
Add DDW to	20 μL

反应物轻轻混匀后，冰上孵育 30min。反应结束后可直接用于后续转化或者保存于-20°C。





维根生物科技有限公司

Vigen Biotechnology (Zhenjiang) Co., Ltd

VigenBR

Tel: 183 628 99236

E-mail: 253540644@qq.com

注:

- 1) 重组片段为 2~3 段时, 载体与各片段加入量约为 0.02 – 0.5 pmols, 重组片段为 4~6 段时, 载体与各片段加入量约为 0.2 – 1 pmols, 载体与加入目的片段的最佳摩尔比为 1:3~5
- 2) 重组片段较多时, 可适当延长反应时间至 1h。

IV: 转化

1. 把感受态细胞置于冰中解冻;
2. 加入用于转化的重组反应产物 2~10 μL , 冰中放置 30min, 42°C 热激 45s;
3. 继续冰上放置 2 min;
4. 添加 500 μL S.O.C 或者 LB 培养基, 37°C 摇床培养 45 min;
5. 离心后上清, 轻轻重悬菌液, 将其均匀涂布于含有相应抗生素的抗 LB 平板;
6. 37°C 倒置培养过夜;

V: 利用菌落 PCR 或酶切验证的方法筛选阳性克隆

Trouble Shooting

Problem	Probable cause	Solution
转化后菌落很少或者没有	DNA 浓度太低	使用推荐的 DNA 用量.
	目的片段或载体中含有污染.	PCR 产物及线性化载体均需纯化
	感受态细胞效率太低	使用效价 $>1 \times 10^8$ cfu/ μg 的感受态细胞效果更好
	载体线性化不完全	载体切胶回收



www.vigenbio.com



Technical Support



维根生物科技有限公司

Vigen Biotechnology (Zhenjiang) Co., Ltd

VigenBR

Tel: 183 628 99236

E-mail: 253540644@qq.com

阳性克隆较少, 多为空载体	被含有相同抗性的载体污染	PCR 产物中可能含有模板质粒, 推荐切胶回收
	平板抗性错误	确保平板新鲜配制且添加正确抗生素.
	载体酶切不完全	酶切时间延长可增加线性化程度, 降低背景



www.vigenbio.com



Technical Support