

**公司产品仅供科学研究使用、不得用于临床诊断！**

商品属性：

产品名称	规格	货号
pUC57simpleEVL Seamless 试剂盒	20 次	P-PR1223

**保存条件：** -20°C保存

**产品介绍：**

区别于拓扑克隆、TA 载体克隆和酶切克隆等常规克隆方法，无缝克隆技术可在重组酶的作用下，只需一步反应，便可将片段克隆到任何载体中的任意位置，得到重组质粒。无缝克隆技术作为一种非常强大的克隆技术，具有快速、简便、高效、多片段组装和定向克隆等特点，用于单个 DNA 片段的克隆，多个 DNA 片段组装克隆以及多位点突变构建等实验目的。

**产品特点：**

- 1.简单、快速、精确、定向克隆，连接过程只需要 15 分钟。
- 2.只需要简单的 PCR 扩增就可以制备片段和载体 DNA，不需要内切酶、连接酶和磷酸化酶。
- 3.可以克隆长片段 DNA。
- 4.pUC57-simpleEVL 线性化载体，经特殊处理，零背景。

**操作步骤：**

1.pUC57-simpleEVL 使用方法：

(1) pUC5-simpleEVL 当做克隆载体使用，只需要在扩增 PCR 产物的上游引物 5' 端添加序列 CTTCGCGAATGCGTTCGAGAT，在下游引物 5' 端添加序列 CGTTCGGTCCCGGCATCCGAT，就可以通过无缝连接到 pUC57-simpleEVL 中。

(2) 测序引物

M13F(-47): CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC

M13R(-48): GAGCGGATAACAATTTCACACAGG

(3)pUC57-simpleEVL 载体为 EcoRV 酶切后的线性化载体 pUC57-simpleEVL。

2. 载体片段的重组连接

(1) 在一个 0.2ml PCR 管中依次加入

组分	体积
PCR 产物 (50-100ng/μl)	1-4μl
pUC57-simpleEVL	1μl
2×Seamless Cloning Mix	5μl
补水至总体积	10μl

(2) 操作：轻轻混合，离心数秒。在 PCR 仪上 50°C 保温 15 分钟。反应结束后，将离心管置于冰上，等待细菌转化。如暂时不转化细菌，可冻存于 -20°C。

**注意：**

1.载体用量一般在 50-100ng 较好。载体和片段的摩尔比为 1:1 至 1:3。片段小于 200bp 时，片段用量可增加至载体的 5 倍量。

2.50°C 反应时间不要超过 60 分钟。

3.转化

(1) 取 2-4 μl 连接产物加到刚刚化冻的感受态细胞中，轻轻混匀，冰水浴 20-30 分钟。

(2) 42°C 水浴热击 90 秒钟，切勿晃动水面。热击结束后立即置于冰水浴中保持 2 分钟。

(3) 往管中加 500 μl 的 SOC 或 LB 培养基，放入 37°C 摇床中 200rpm 左右培养 60 分钟。

(4) 4000rpm 离心 1 分钟，弃掉部分上清，保留 100-200 μl，用吸头轻轻吹打菌块重悬细菌，取一半菌液涂布于含抗生素的 LB 固体培养平板上，待液体吸干后，倒置平板，37°C 培养过夜。

4.阳性克隆鉴定：

(1) 菌落 PCR 方法；

(2) 限制性酶切分析方法;

(3) DNA测序分析方法。

---

[www.pyram.cn](http://www.pyram.cn)