



Smart Assembly Cloning Kit

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 实验步骤.....	1
3. 操作流程.....	3
4. 订购信息.....	4

1. 产品介绍

Smart Assembly Cloning Kit 是一种简单、快速并且高效的 DNA 无缝克隆试剂盒，可将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。使用任意方式将载体进行线性化，在插入片段正/反向 PCR 引物 5'端引入线性化载体的末端序列，使得 PCR 产物 5'和 3'最末端分别带有和线性化载体两末端一致的序列(25bp-40 bp)。这种两端带有载体末端序列的 PCR 产物和线性化载体按一定比例混合后，在重组酶的催化下，50℃反应 15 min 即可进行转化，完成定向克隆。作为新一代的重组克隆试剂盒，相比同类产品，其核心优势在于专门针对多片段重组反应进行优化，可以一次实现多至 12 个插入片段的顺序拼接克隆。

1.1 产品组分

表 1. 产品组分

组分	5 rxn	25rxn
Smart 2X enzymes mixturet	50 μ l	500 μ l
阳性对照线性化载体和 2 个 DNA 片段	10 μ l	20 μ l

保存：-20℃可以长时间存放,避免反复冻融

1.2 适用范围

- 快速克隆
- 高通量克隆
- 无缝克隆
- 定点突变

1.3 自备材料

DNA 片段；线性化载体；

感受态细胞：克隆菌株制备的化学感受态细胞；

DH5 α Competent E.coli Strain 常规克隆，适用于<15 kb 质粒； XL10 Competent E.coli Strain 大片段克隆，适用于>10 kb 质粒；

其他材料：ddH₂O、PCR 管、PCR 仪等。

2. 实验步骤

2.1 线性化载体制备

2.1.1 选择合适的克隆位点，对载体进行线性化。推荐尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域进行克隆。当载体克隆位点上下游 25-40bp 区域内 GC 含量均在 40% - 60%之间时，重组效率将达到最大。

2.1.2 载体线性化方式：可以选择限制性内切酶酶切消化，或反向 PCR 扩增。

- 酶切制备线性化载体时，推荐使用双酶切方法使载体线性化完全，降低转化背景(假阳性克隆)；若使用单酶切线性化，请适当延长酶切时间以减少环状质粒残留，降低转化背景。
- 反向 PCR 扩增制备线性化载体时，推荐使用高保真聚合酶

2.2 插入片段获得

2.2.1 引物设计

设计原则是通过在引物 5'端引入同源序列，使扩增产物之间以及 扩增产物与线性化克隆载体之间都具有能够相互同源重组的完全一致的序列(25bp - 40 bp，不包括酶切位点)。克隆正向引物(5'-3')：线性载体正向 25-40 nt 重叠区序列(3'末端算起)+插入片段正向特异引物序列 (18-25 nt) 克隆反向引物(5'-3')：线性载体反向 25-40 nt 重叠区序列(3'末端算起)+插入片段反向特异引物序列 (18-25 nt)

注意：重叠区的碱基数至少 25 bp，并且多段重叠区域之间的 Tm 值尽量保持一致且 > 60℃ (AT pair = 2℃ and GC pair=4℃)，否则可延长碱基数目直到符合要求。按照线性载体末端的结构 (5'突出，3'突出，平末端)，引物设计也分 3 种情况：



1) 载体酶切形成 5'突出末端

从 3'端开始计算，往回算 25-40 bp (本举例采用了 BamHI, puc57 载体和 25 bp 末端重叠相同序列)，加到目的片段特异引物序列前面即可，以上引物设计完成克隆连接后，酶切位点将会消失（不保留酶切位点），如果需要保留酶切位点，需要在载体末端 25 bp 重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐 5'突出末端的序列,完成克隆连接后，酶切位点依然存在（保留酶切位点）。

5'... NNNNN GAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATATCG3' 目标序列(不保留酶切位点)

5'... NNGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATATCGCTAG3' 目标序列(保留酶切位点)

2) 载体酶切形成 3'突出末端

从 3'端开始计算，往回算 25-40 bp (本举例采用了 KpnI, puc57 载体和 25 bp 末端重叠相同序列)，加到目的片段特异引物序列前面即可，以上引物设计完成克隆连接后，酶切位点将会消失，如果需要保留酶切位点，需要在载体末端 25 bp 重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐酶切位点的缺失碱基(C),完成克隆连接后，酶切位点依然存在（保留酶切位点）。

5'... NNN GACGTTGTAACACGACCGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTAC3' 目标序列(不保留酶切位点)

5'... NN GACGTTGTAACACGACCGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACC3' 目标序列(保留酶切位点)

3) 载体酶切形成平末端

从 3'端开始计算，往回算 25-40bp (本举例采用了 EcoR V, puc57 载体, 25 bp 末端重叠相同序列)，加到目的片段特异引物序列前面即可，以上引物设计完成克隆连接后，酶切位点将会消失，如果需要保留酶切位点，需要在载体末端 25 bp 重叠序列和目的片段特异引物序列之间补齐酶切位点缺失的序列(ATC),完成克隆连接后，酶切位点依然存在（保留酶切位点）。

5'... NNNCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGAT 3' 目标序列(不保留酶切位点)

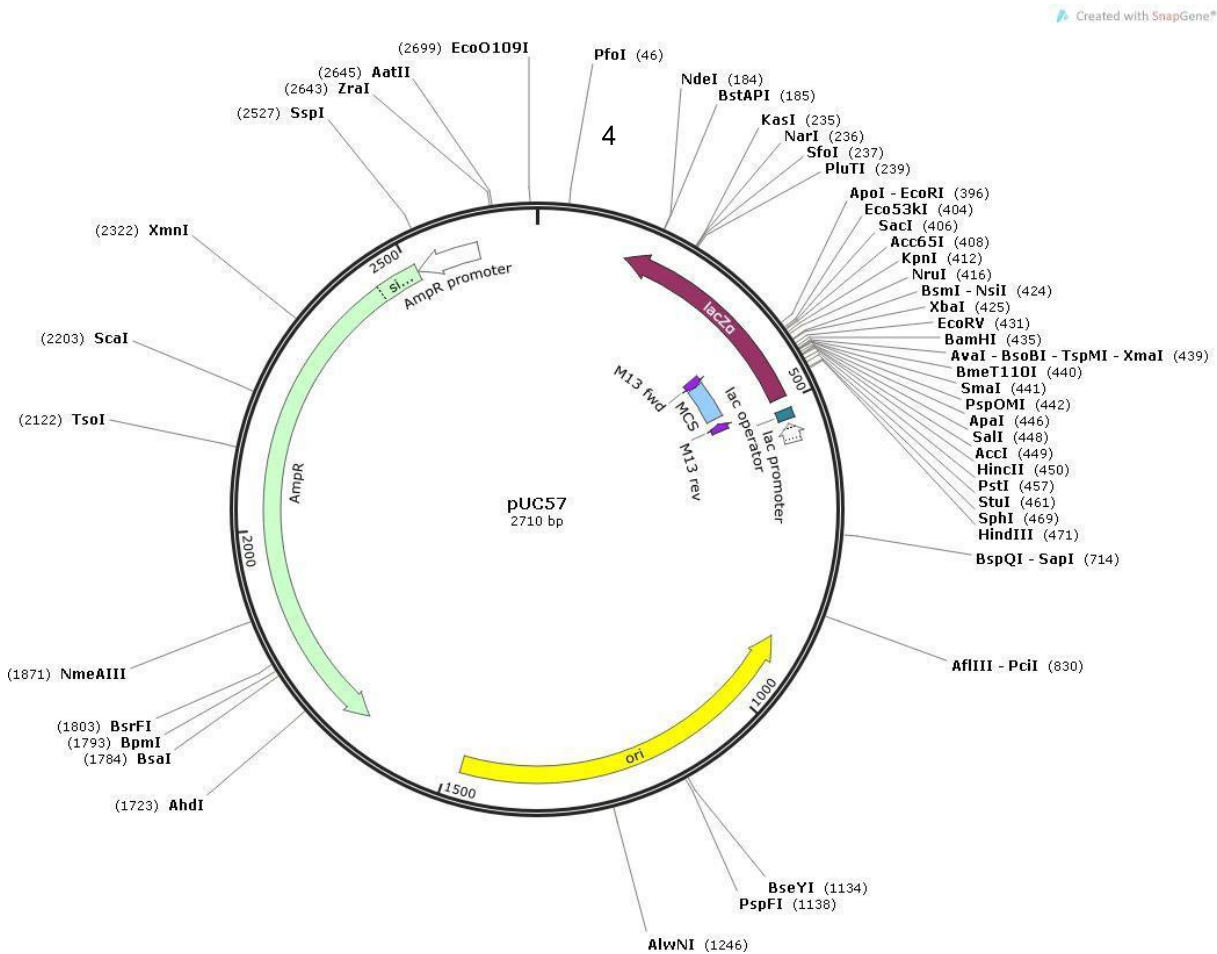
5'... NNCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATATC 3' 目标序列(保留酶切位点)

➤ PUC57 载体序列

```
TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGG
GAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGT
ACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCGCATTACAGG
CTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCCGA
TTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCA
TCTAGATATCGGATCCCGGGCCCGTGCAGTGCAGAGGCCTGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGA
AATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTC
ACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGTTTTCCAGTCGCGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGG
GAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTA
TCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAA
GGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCA
AGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGA
CCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGT
TCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATC
GTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGG
CGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAG
TTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGA
TTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAG
GGATTTTGGTCAAGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG
AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTG
ACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCA
CCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCC
AGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCAGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCG
TGGTGTACAGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGC
AAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACT
GCATAATTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATG
CGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATCTTTGAAA
ACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTC
AGCATCTTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA
AATGTTGAATACTACTACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTA
TTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAACCATTATTATCATGACATT
AACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC
```



➤ PUC57 载体图



3.2.2 多个插入片段的克隆引物设计:与载体两端连接的插入片段引物设计方法与之前一样，其他插入片段保证片段与片段之间有25-40 bp的重叠区即可。

3.2.3 插入片段 PCR 扩增。插入片段可用任意 PCR 酶(Taq 酶或高保真酶)扩增，无需考虑产物末端有无 A 尾(重组过程中将被去除，在最终载体中不会出现)。但为了减少扩增突变的引入，推荐使用高保真聚合酶。

3. 操作流程

表 2. 反应体系

	克隆反应	阳性对照
每个 DNA 片段	0.1 pmol * X μl	10 μl
阳性对照线性化载体和 2 个 DNA 片段	0.1 pmol * X μl	10 μl
Smart 2X enzymes mixture	10 μl	10 μl
去离子水	至 20 μl	

1) 在冰上配置以下反应体系：

注：* 阳性对照含载体和 2 个 DNA 片段

* 若使用未纯化的 PCR 产物进行重组反应，未纯化的 DNA 片段的体积不能超过总反应体积的 10%。

2) 用移液枪轻柔地混匀反应物。

3) 将反应管置于 PCR 仪中 50℃ 孵育 15 分钟。

4) 吸取 2 μl 的反应液转化大肠杆菌感受态细胞。（推荐使用高效感受态细胞，即每 μg pUC19 载体转化后至少能得到 >2×10⁸ 转化子）

5) 若需要进行电转，将反应液稀释 5 倍，再吸取 1 μl 进行转化感受态细胞。



- 6) 取 1/10 体积的转化细胞进行涂布，若您克隆多于 3 个目的片段，建议您对转化后的感受态离心后再涂布。对于阳性对照反应，取 1/10 体积的转化细胞涂布在含 0.1 mM IPTG 的氨苄培养板上。
- 7) 37°C 过夜培养。

➤ **计算 DNA 片段的加入量**

- 1) 每个反应中单个 DNA 片段的推荐使用量为 0.1 pmols;
- 2) 当克隆一到两个 DNA 片段时，推荐片段和载体的摩尔比为 2:1;
- 3) 当克隆三个以上 DNA 片段时，推荐片段和载体的摩尔比为 1:1;
- 4) 当克隆片段小于 200 bp 时，推荐片段和载体的摩尔比为 5:1。
- 5) 使用 UV 或荧光检测目的 DNA 片段的浓度，参考下列公式计算反应中每个 DNA 片段的用量。

$$\mu\text{lof DNA fragment} = \frac{0.65 \times \text{pmol} \times \text{bp}}{\text{ng}/\mu\text{l}}$$

或者可以参考下面的表格，根据片段的长度来粗略估计相应的每个反应中 DNA 片段的用量(例如：每个反应中加入 0.1 pmol 的 DNA 片段)：

表 3. DNA 片段

DNA 片段大小	每个反应 DNA 加入量
0.5 kb	33 ng
1 kb	67 ng
1.5 kb	100 ng
2 kb	133 ng
3 kb	200 ng
5 kb	330 ng

4. 订购信息

名称	货号	规格
Smart Assembly Cloning Kit	SC00450	50 次