



pUC57EVL Seamless cloning kit

产品信息:

组分	CL118-01 (20 次)	CL118-02 (20 次×3)
pUC57EVL (50ng/μl)	20μl	20μl×3
2×Seamless Cloning Mix	100μl	100μl×3

保存条件: -20℃ 保存一年

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.pUC57EVL 线性化载体，经特殊处理，零背景。

操作步骤:

1.pUC57EVL 使用方法:

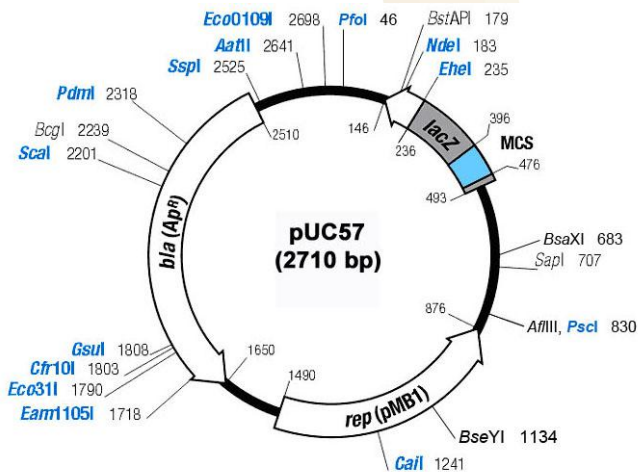
(1) pUC5EVL 当做克隆载体使用，只需要在扩增 PCR 产物的上游引物 5' 端添加序列 CCTCGGAATGCATCTAGAT，在下游引物 5' 端添加序列 CGACGGGCCCGGATCCGAT，就可以通过无缝连接到 pUC57EVL 中。

(2) 测序引物

M13F (-47): CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC

M13R (-48): GAGCGGATAACAATTCACACAGG

(3) pUC57EVL 载体为 EcoRV 酶切后的线性化载体 pUC57EVL，图谱及多克隆位点见下图。



M13F(-47) primer binding site
 AAAGGGGATGTGCTGCAAGCGGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACCTGTGAAAACGACGGCCAGT
EcoRI SacI KpnI XbaI EcoRV BamHI SmaI PstI PaeI HindIII
 GAATTCGAGCTCGGTACTCGCGAATGCATCTAGATATCCGATCCCGGGCCCGTCCACTGCAGAGGCTGCATGCAAGCTT
 M13R(-48) primer binding site
 GCGGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCAT

2. 载体片段的重组连接

按下表，在一个 0.2ml PCR 管中依次加入

组分	体积
PCR产物 (50-100ng/μl)	1-4μl
pUC57EVL (50ng/μl)	1μl
2×Seamless Cloning Mix	5μl
补水至总体积	10μl

操作：轻轻混合，离心数秒。在PCR仪上50℃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℃。

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℃反应时间不要超过60分钟。

3.转化

(1) 取2-4μl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℃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500μl的SOC或LB培养基，放入37℃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100-200μl，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℃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。

5.pUC57 载体序列：

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCC
 GGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCC
 CGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACT
 ATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGA
 AATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCG
 CCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTT
 CGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAG
 TTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTAACGACGCGCC
 AGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATATCGGATCCC
GGGCCCGTCCGACTGCAGAGGCCTGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGT
 CATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAAC
 ATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA
 GCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGTCACTGCCCCGTTTCCAGTCGGGA
 AACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAG
 GCGGTTTGCATATTGGGCGCTTCCGCTTCCCTCGTCACTGACTCGCTG
 CGCTCGGTCGTTGCGCTGCGCGAGCGGTATCAGTCACTCAAAGGCGG
 TAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACAATGTG
 AGCAAAAAGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCT
 GCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGAC
 GCTCAAGTCAGAGGTGGCGCAAACCCGACAGGACATAAAGATACCAGG
 CGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCG
 CTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC
 TCATAGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCA
 AGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCCGACCGCTGCGCCTTA
 TCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCC

ACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC
GGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAA
GAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAA
AGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTG
GTTTTTTTGTGGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCA
AGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA
ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACC
TAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATA
TGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA
TCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCG
TGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGC
AATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATA
AACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTAT
CCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGT
TCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGT
GGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATCAGCTCCGGTCCCAAC
GATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAG
CTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTAT
CACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCC
GTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGA
ATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGAT
AATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAAC
GTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGT
TCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTACGATCTTTTACTTTC
ACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAA
AAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTT
TTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAC
ATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACAT
TTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATATTATCATGACA
TTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC