

LightNing® DNA Assembly Mix Plus

REF: EG21202S

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格
LightNing® DNA Assembly Mix Plus	250 µl
pUC19 Control Plasmid, Linearized (Amp ^r , 40 ng/µl)	5 µl
500 bp Control Fragment (20 ng/µl)	5 µl

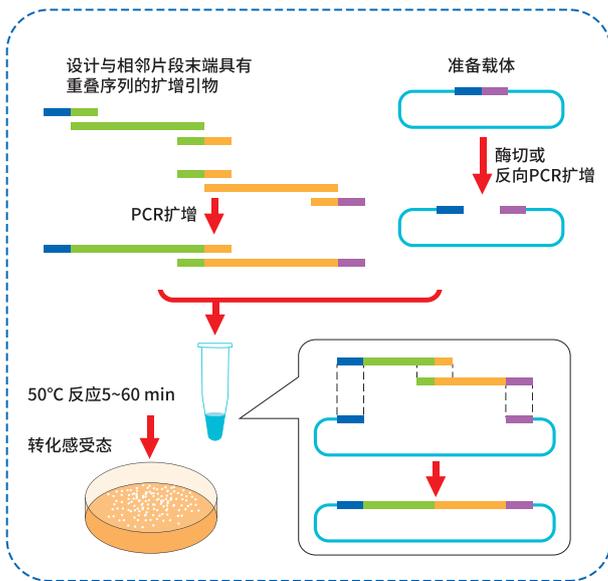
产品简介

基于重组原理的无缝克隆技术，作为新一代的克隆方法，不依赖繁琐的酶切、连接步骤，也不需要末端补平等操作，依据 DNA 片段与线性化载体末端的 15~25 nt 同源序列的重组，可将插入片段克隆至任意线性载体的任意位点，载体自连背景极低，是一种简单、快速、高效的 DNA 定向克隆技术。

LightNing® DNA Assembly Mix Plus 无缝克隆试剂盒，一次反应可完成单至多个 DNA 片段的重组，最快仅需 5 分钟即可完成单片段重组，且阳性率高于 95%。Mix 中添加的辅助因子，有效提高克隆阳性率；经优化的反应体系，能够一定程度上耐受未纯化 PCR 产物中含有的杂质。升级版的无缝克隆试剂盒具有更高的阳性率、更好的兼容性。

实验步骤

1. 实验流程概要



2. 线性化克隆载体制备

选择合适的克隆位点，对载体进行线性化，载体的线性化可以通过酶切或反向 PCR 扩增完成。

① 酶切制备

一些限制性内切酶不能有效地消化超螺旋 DNA，因此可能会留下不同数量的未切割载体 DNA，降低阳性率。推荐使用 LightNing® 快速内切酶进行酶切（单酶切或者双酶切），使载体线性化完全，以降低转化背景（未切割的载体转化获得的假阳性克隆）。

注 1：经酶切进行线性化的载体无需去磷酸化，推荐使用双酶切。

注 2：酶切完成后，建议将内切酶失活或对目的产物纯化后用于重组反应。

② 反向 PCR 扩增制备

为减少扩增突变的引入，推荐使用高保真 PCR Mix 进行扩增。推荐使用预线性化质粒作为模板，以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。

注 1：PCR 产物无非特异性条带时，推荐使用 LightNing® DpnI (货号：EG15585) 消化质粒模板即可用于重组反应；反之建议将 PCR 产物纯化后使用。

注 2：多片段克隆时，建议将 PCR 产物纯化后使用。

3. 插入片段 PCR 引物设计

PCR 引物的 5' 端必须包含与其相邻片段（插入片段或载体）末端同源的 15~25 nt（推荐 18 nt）序列。假如载体为粘性末端，且 3' 端突出，则引物设计必须包含突出部分；若 5' 端突出，则引物设计可以包含突出部分，也可以不包含。

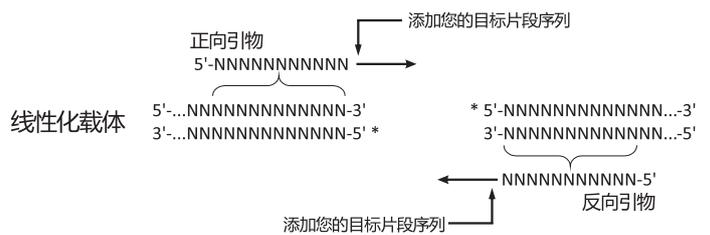
插入片段正向扩增引物：

5'—上游载体末端同源序列 + 酶切位点（可选）+ 基因特异性正向扩增序列— 3'

插入片段反向扩增引物：

3'—基因特异性反向扩增序列 + 酶切位点（可选）+ 下游载体末端同源序列—5'

注 1：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 nt 区域内 GC 含量为 40%~60% 时，重组效率最高；



注 2：本试剂盒所提供的 pUC 19 载体 (Amp^r) 连接端序列如下：

```

                    EcoRI
5' -ATGACCATGATTACGCCA-3'   5' -AATTCAGTGGCCGTCGTTTTAC-3'
3' -TACTGGTACTAATGCGGTTCGA-5'   3' -GTGACCGGCAGCAAAATG-5'
                    HindIII
    
```

4. 插入片段的 PCR 扩增

推荐使用高保真 PCR Mix 进行扩增，以减少扩增突变的引入。建议使用纯化后的 PCR 产物进行无缝克隆反应，若 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定为特异性扩增产物，可直接使用，但加样体积不应超过总反应体积的 20%。

5. 重组反应

① 于冰水浴中配置以下反应体系：

组分	反应体系	阴性对照	阳性对照 (如有必要)
LightNing [®] DNA Assembly Mix Plus	5 μ l	5 μ l	5 μ l
线性化载体 ^a	50~200 ng	50~100 ng	pUC 19 Control Plasmid, Linearized, 1 μ l
插入片段 ^b	10~200 ng	-	500 bp Control, Fragment, 1 μ l
ddH ₂ O	To 10 μ l		

a. 最适载体用量 (ng) = 0.02 × 载体碱基对数, 即 0.03 pmol。

b. 插入单片段, 最适片段用量 (ng) = 0.04 × 片段碱基对数; 插入多片段, 每片段最适用量 (ng) = 0.02 × 片段碱基对数。

注 1: 若插入单片段的长度大于载体, 则应互换载体与插入片段用量;

注 2: 若插入片段的长度小于 200 bp, 则插入片段应使用 5 倍载体用量;

注 3: 若按上述公式计算得到的用量超过最低/最高值, 则建议直接按最低/最高用量使用;

注 4: 载体片段过长、插入片段过长或片段数过多, 克隆阳性率均会降低。

重组反应体系配制完成后, 用移液枪轻轻吸打混匀各组分, 避免产生气泡, 切勿涡旋。

② 将反应体系置于 50°C, 反应 5~60 min。

注 1: 推荐使用 PCR 仪等温控比较精准的仪器进行反应, 反应时间不足或太长克隆效率均会降低;

注 2: 插入 1~2 个片段时, 推荐反应时间为 5~15 min; 插入 3~5 个片段时, 推荐反应时间为 15~30 min;

注 3: 当载体骨架在 10 kb 以上或插入片段在 4 kb 以上时, 建议延长反应时间到 30~60 min;

注 4: 50°C 反应完成后, 建议进行瞬时离心, 将反应液收集至管底。

③ 将反应液离心管置于冰上冷却, 之后进行转化或者储存于 -20°C。

注 1: -20°C 储存的重组产物, 建议在 1 周内使用。

6. 重组产物转化

取 5~10 μ l 反应液, 加入到 100 μ l 感受态细胞中, 缓慢吸打混匀, 冰上放置 30 min。42°C 热激 45~60 s, 冰浴 5 min。加 500 μ l SOC 或 LB 培养基, 37°C 振荡培养 40~60 min (200 rpm)。将菌液均匀涂布在含有对应抗生素的平板上, 倒置于 37°C 过夜培养。

注 1: 不同感受态细胞最后的克隆阳性率会有所差别, 推荐使用转化效率 > 10⁸ CFU/ μ g 的感受态细胞;

注 2: 菌落数取决于 PCR 产物与线性化载体的数量和纯度;

注 3: 阳性对照平板通常生长大量白色单菌落, 阴性对照平板只生长很少的菌落。

7. 阳性克隆检测

挑取单菌落至 10 μ l ddH₂O 中混匀, 95°C 裂解 10 min 后, 取 1 μ l 裂解液作为模板, 进行菌落 PCR 鉴定, 或将单菌落接种至抗性培养基中培养过夜后, 提取质粒进行酶切鉴定。

阳性对照的阳性克隆检测, 菌落 PCR 引物使用通用引物 M13F 与 M13R, 酶切鉴定用 HindIII 与 EcoRI。

注 1: 菌落 PCR 时建议至少使用一条通用引物, 避免假阳性结果;

注 2: 必要时可进一步对阳性结果进行测序鉴定。

注 3: M13F: TGTA AACGACGGCCAGT

M13R: CAGGAAACAGCTATGAC

常见问题

问题描述	原因	解决方法
转化效率低	感受态效率低下	使用新制备或妥善保存的感受态细胞。
	DNA 片段比例不佳	按照说明书推荐的最适用量和比例配制反应体系。载体和插入片段的浓度测定: 若线性化载体与插入片段已经过纯化, 且经电泳检测条带单一或无 Smear 残留时, 可使用微量核酸蛋白检测仪等基于分光光度法的仪器进行浓度测定, 但只有当 A260/A280 在 1.8~2.0 之间时浓度值可信; 若线性化载体与插入片段未经过纯化, 也可使用琼脂糖电泳测定样品浓度。
	DNA 片段纯度不够	对载体和插入片段进行胶回收纯化。由于 EDTA 等金属离子螯合剂会抑制无缝克隆反应, 因此纯化产物应溶解于 ddH ₂ O 中, 切勿使用 Tris-EDTA 等缓冲液。
	反应产物过量	在转化体系中, 无缝克隆反应产物体积不应超过感受态细胞体积的 10%。
大量克隆不含插入片段	载体线性化不完全	酶切制备线性化载体时, 提高快速内切酶的使用量, 延长反应时间, 使用胶回收纯化酶切产物。
	相同抗性质粒污染	以质粒为模板进行插入片段 PCR 扩增时, 使用预线性化质粒作为扩增模板, 使用 DpnI 等甲基化敏感型内切酶对扩增产物进行处理, 或对产物进行胶回收纯化。
	平板抗性不足	确保使用正确的抗生素, 并使用新鲜制备的抗生素平板。
大量克隆含有不正确插入片段	非特异性 PCR 扩增产物	优化 PCR 体系, 提高扩增特异性, 或胶回收纯化 PCR 产物重叠序列的扩增引物。