

# DNA Assembly Mix Ultra

REF: EG24204S

## 储运条件

-20°C

## 产品组成

| 组分  | 规格     |
|---|--------|
| DNA Assembly Mix Ultra  | 250 µl |
| pUC19 Control Plasmid, Linearized (Amp <sup>r</sup> , 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。

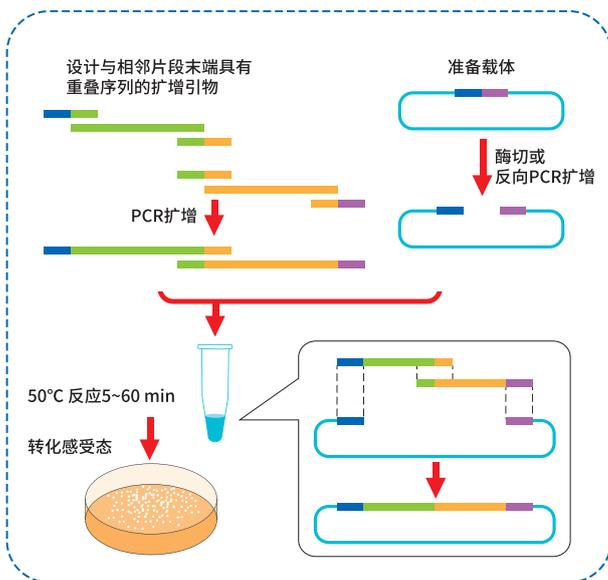
DNA Assembly Mix Ultra 无缝克隆试剂盒，一次反应可完成单至多个 DNA 片段的重组，最快仅需 5 分钟即可完成单片段重组，且阳性率高于 95%。Mix 中使用 HiFi Taq DNA Ligase，相较于普通的 Taq DNA Ligase，拥有更高的保真度，显著提高无缝克隆成功率。同时，Mix 中还添加了转化增强剂，大幅提高转化子数量。在保证保真度和转化效率的情况下，DNA Assembly Mix Ultra 进一步优化了组分，使其稳定性显著提高，可以耐受热、氧环境。

## 产品应用

快速克隆；多片段 DNA 组装；DNA 定点突变。

## 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载体纯化后用于重组反应。

注 3：载体胶回收时建议长时间电泳与残留的环状质粒区分开后再切胶，以减少假阳性率。

#### 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® Dpnl (货号：EG15585) 1 µl 加入 50 µl PCR 产物中 37°C 1 h, 80°C 20 min 消化质粒模板即可用于重组反应；反之建议将 PCR 产物胶回收后使用。

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：

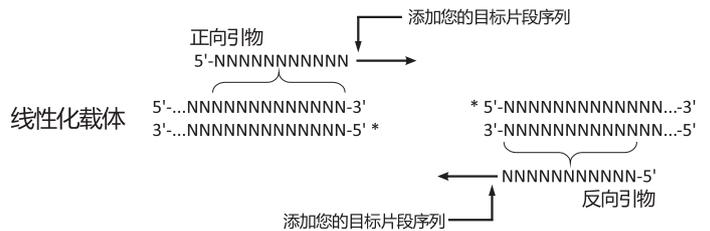
5'—上游载体末端同源序列 + 酶切位点（可选）+ 基因特异性正向扩增序列— 3'

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：当重组转化子产物 >10 kb 以上时，推荐按 20~25 bp 同源臂设计引物。



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

EcoRI  
5' -ATGACCATGATTACGCCA-3'      5' -AATTCAGTGGCCGTCGTTTTAC-3'  
3' -TACTGGTACTAATGCGGTCGA-5'      3' -GTGACCGGCAGCAAAATG-5'  
HindIII

注 3：包含多个重复序列的片段无法采用无缝克隆的策略进行连接。

### 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 <sup>°</sup> | 阳性对照 (如有必要) <sup>d</sup>                      |
|------------------------|---------------|-------------------|---|
| DNA Assembly Mix Ultra | 5 $\mu$ l     | 5 $\mu$ l         | 5 $\mu$ l                                     |
| 线性化载体 <sup>a</sup>     | 50~200 ng     | 50~100 ng         | pUC 19 Control Plasmid, Linearized, 1 $\mu$ l |
| 插入片段 <sup>b</sup>      | 10~200 ng     | -                 | 500 bp Control, Fragment, 1 $\mu$ l           |
| ddH <sub>2</sub> O     | To 10 $\mu$ 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。  
 c. 阴性对照可用于确认线性化载体中是否有环状质粒残留, 推荐进行。  
 d. 阳性对照可用于排除其它实验材料及操作因素的影响。  
 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, 克隆菌落数及阳性率均会降低。  
 注 5: 单点突变按照最适载体用量加入体系, 多点突变按照多片段每片段最适用量加入体系。

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, 反应时间不足克隆效率会降低;  
 注 2: 插入 1~2 个片段时, 推荐反应时间为 15 min; 插入 3~5 个片段时, 推荐反应时间为 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  $\mu$ l 反应液, 加入到 100  $\mu$ l 感受态细胞中, 缓慢吸打混匀, 冰上放置 30 min。42°C 热激 60 s, 冰浴 5 min。加 500  $\mu$ l SOC 或 LB 培养基, 37°C 振荡培养 50~60 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 > 10<sup>8</sup> CFU/ $\mu$ 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  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 中混匀, 95°C 裂解 10 min 后, 取 1  $\mu$ 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       | 感受态细胞的转化效率至少需 >10 <sup>7</sup> CFU/ $\mu$ g。可进行简单检测, 转化 0.1 ng pUC19 质粒, 生长 1000 个菌落, 估算转化效率为 10 <sup>7</sup> CFU/ $\mu$ g。当重组转化子产物 >10 kb 以上时, 推荐使用 10 <sup>8</sup> CFU/ $\mu$ g 感受态细胞或者适用于大质粒 DNA 和重组产物转化的感受态细胞。 |
|               | 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 <sub>2</sub> 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。   |
|               | 多重重复序列片段      | 插入片段中含有多个重复序列, 推荐使用适合重复序列 DNA 片段克隆的感受态细胞或者采用酶切连接或 GoldenGate 方法进行克隆。   |