

DNA Assembly Mix Mono

REF: EG25202-S/M

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格 S	规格 M
DNA Assembly Mix Mono	500 µl	5×500 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。

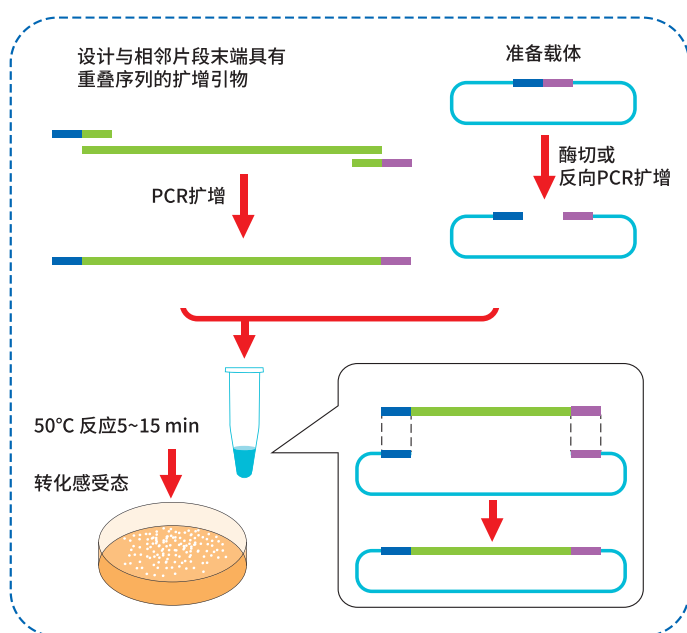
DNA Assembly Mix Mono 无缝克隆试剂盒，专为单片段优化，最快仅需 5 分钟即可完成单片段重组，且阳性率高于 95%。DNA Assembly Mix Mono 相较于 DNA Assembly Mix Ultra (REF: EG24204)，不依赖连接酶，组分更简单，对未纯化的 PCR 产物兼容性更强。同时，由于不含连接酶，依靠大肠杆菌本身的修复系统，保真度更高。

产品应用

快速克隆；单片段 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® DpnI (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。

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：

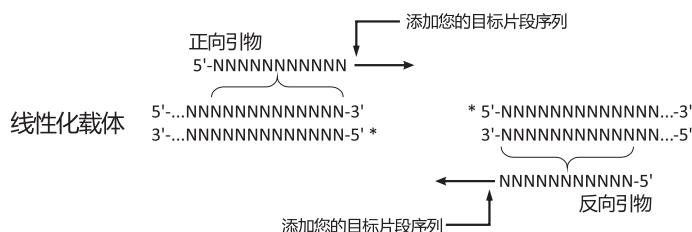
5'—上游载体末端同源序列 + 酶切位点（可选）+ 基因特异性正向扩增序列—3'

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 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 [°]
DNA Assembly Mix Mono	10 μ l	10 μ l
线性化载体 ^a	50~200 ng	50~100 ng
插入片段 ^b	10~200 ng	-
ddH ₂ O	To 20 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。

c. 阴性对照可用来确认线性化载体中是否有环状质粒残留，推荐进行。

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。

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℃，反应 5~15 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 2：50℃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℃。

注 1：-20℃储存的重组产物，建议在 1 周内使用。

6. 重组产物转化

取 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℃ 热激 60 s，冰浴 5 min。加 500 μ l SOC 或 LB 培养基，37℃ 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℃ 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；

7. 阳性克隆检测

挑取单菌落至 10 μ l ddH₂O 中混匀，95℃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。

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。

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 ⁷ CFU/ μ 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 ⁷ CFU/ μ g。当重组转化子产物 >10 kb 以上时，推荐使用 10 ⁸ CFU/ μ 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。
	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 Golden Gate 方法进行克隆。