

DNA Assembly Mix Plus KIT

货号: D0204P

存储温度: -20°C

产品组分

| 组分/规格 | 10T | 25T | 50T |
|---|------|-------|-------|
| DNA Assembly Mix PLUS | 50μl | 125μl | 250μl |
| pUC19 Control Plasmid, Linearized(Ampr, 40 ng/μl) | 5μl | 5μl | 5μl |
| 500 bp Control Fragment (20 ng/μl) | 5μl | 5μl | 5μl |

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 15~25nt 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。

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 PLUS 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。

使用简单——兼容 PCR 与酶切体系, 省去繁琐的纯化步骤

超高效率——可以稳定支持 5-6 片段在同一克隆体系

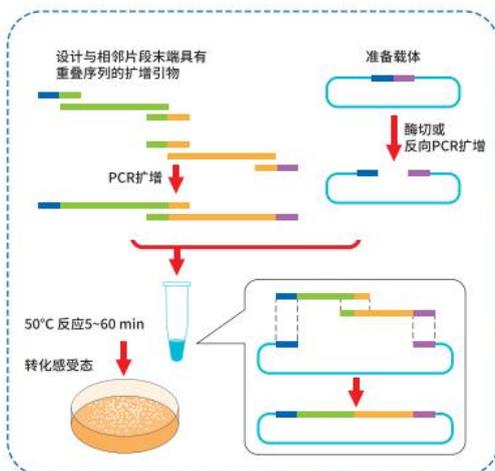
稳定可靠——37°C 放置一周或冻融 30 次, 无明显下降

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

推荐使用 LabFD™ 快速内切酶进行双酶切, 使载体线性化完全, 以降低转化背景(假阳性克隆); 若使用单酶切进行线性化, 可以适当延长酶切时间以减少环状质粒残留。

注 1: 经双酶切进行线性化的载体无需去磷酸化, 经单酶切则需要去磷酸化;

注 2: 酶切完成后, 应将快速内切酶失活或对目的产物纯化后再用于重组反应。

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 LabFD™ DpnI (货号: F5585S) 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 18nt) 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:

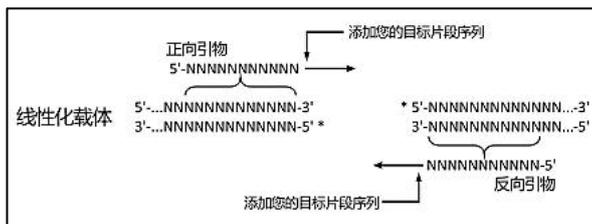
5'—上游载体末端同源序列+酶切位点 (可选) + 基因特异性正向扩增序列—3'

插入片段反向扩增引物:

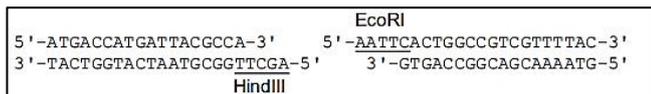
3'—基因特异性反向扩增序列+酶切位点 (可选) + 下游载体末端同源序列—5'

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 (Ampr) 连接端序列如下:



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 ^c | 阳性对照 ^d (如有必要) |
|--------------------|-----------|-------------------|---|
| DNA Assembly Mix | 5 μl | 5 μl | 5 μl |
| 线性化载体 ^a | 50~200 ng | 50~100 ng | pUC19 Control Plasmid, Linearized, 1 μl |
| 插入片段 ^b | 10~200 ng | - | 500 bp Control, Fragment, 1 μl |
| ddH ₂ O | To 10 μl | | |

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。

- 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. 阴性对照可用来确认线性化载体中是否有环状质粒残留, 推荐进行。
- d. 阳性对照可用来排除其它实验材料及操作因素的影响。

注 1: 若插入单片段长度大于载体, 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, 克隆菌落数和阳性率均会降低。

② 将反应体系置于 50°C, 反应 5~15min。

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 5-15min, 插入 3-5 个片段时, 推荐反应时间 30min;

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 30-60min;

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 5~10μl 反应液, 加入到 100 μl 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 μl 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 > 108 CFU/μg 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 10μl ddH₂O 中混匀, 95°C 裂解 10 min 后, 取 1μl 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: CAGGAAACAGCT ATGAC

