兰博利德 LABLEAD
高 新 技 术 企 业

DNA Assembly Mix Promax

货号：D0206P

存储温度：-20°C，有效期 2 年

产品组分

组分	50T
DNA Assembly Mix Promax	250μl
pUC19 Control Plasmid, Linearized (Ampr, 40 ng/μl)	5μl
500 bp Control Fragment (20 ng/μl)	5μl

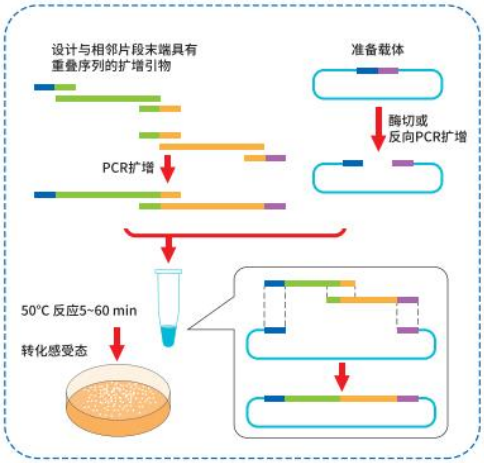
产品简介

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 Promax 无缝克隆试剂盒单次反应可完成 1~15 个片段的组装，最快仅需 1min 即可完成单片段重组，阳性率高达 95%。通过优化缓冲液组分与酶的配比，DNA Assembly Mix Promax 与 DNA Assembly Mix ultra 相比显著提升了对未纯化 PCR 产物的耐受性及产品稳定性，无惧氧化、冻融影响。此外，DNA Assembly Mix Promax 与 DNA Assembly Mix Ultra 同样使用 HiFi Taq DNA Ligase，连接保真度高。

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，单酶切则需要去磷酸化；

2. 酶切完成后，应将载体进行纯化方可进行重组反应，未纯化的酶切产物会抑制转化。

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. 使用环状且 Dam$^+$的质粒作为模板时，若 PCR 产物无非特异性条带，强烈建议使用 LabFD DpnI(货号:F5585SS) 1 ul 加入 50 ul PCR 产物中 37°C 1h,65°C 5min 消化质粒模板，以减少假阳性。DpnI 消化后的 PCR 产物可不纯化使用，加入体积不超过反应体积的 20%，但重组效率会降低，推荐纯化后进行重组。

2. 3 片段以上克隆或 PCR 产物有非特异性带时，需将 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'

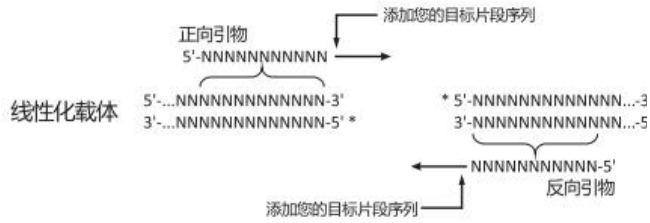
插入片段反向扩增引物：

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'

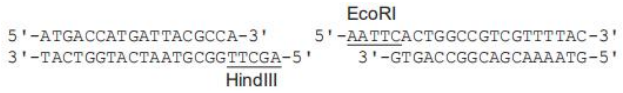
注 1. 尽量选择无重复序列且 GC 含量均匀的区域进行克隆，当载体克隆位点上下游 25 nt 区域内 GC 含量为 40%~60%时，重组效率最高；

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

3. 如果最终引物长度超过 40bp，推荐在引物合成时选用 PAGE 纯化，可提高克隆成功率。



注 4：本试剂盒所提供的 pUC 19 载体（Amp^r）连接端序列如下：



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且无引物二聚体，可直接使用，但片段数量超过 3 个或组装长度超过 5 kb 的片段时强烈建议纯化后使用，以保证成功率。

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 1[c]	阴性对照 2[d]	阳性对照（如有必要）[e]
DNA Assembly Mix Promax	5μl	5μl	5μl	5μl
线性化载体（ng）[a]	50~200	50~100	-	pUC19 Control Plasmid,Linearized, 1μl
插入片段[b]（ng）	10~200	-	10~200	500 bp Control, Fragment, 1μl
ddH_2O	To 10μl			

a. 最适载体用量(ng)=0.02×载体碱基对数，即 0.03pmol。

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 1 可用来确认线性化载体中是否有环状质粒残留，使用首次回收的线性化载体时强烈建议设置，确认无载体背景后可不再设置。

d. 阴性对照 2 当插入片段扩增模板是与克隆载体抗性相同的环状质粒时，推荐进行。建议将线性化载体与插入片段的环状质粒残留检测独立进行。

e. 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. 若插入单片段的长度大于载体，则应互换载体与插入片段用量；

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；

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；

4. 载体用量允许范围为 0.006~0.15 pmol；

5. 片段载体摩尔比应控制在 10 以内；

6. 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。

7. 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℃，反应 5~60min。

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；

2. 插入 1-2 个片段时，推荐反应时间 5-15min，，追求超快速连接时可缩短至 1~5 min，但菌落数可能有所下降；插入 3~5 片段，推荐时间 15~30 min；插入 6~10 片段，推荐时间 30~60 min；

3. 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。

2. 连接产物无法短时间内进行转化时，可在冰上或 4℃放置 1~4 h，连接效率不受影响。

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 30min。42℃热激 60s，冰浴 5 min。加 500 μl SOC 或 LB 培养基，37℃振荡培养 50~60min（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/μg 的感受态细胞；

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 μl ddH2O 中混匀，95℃裂解 10 min 后，取 1 μl 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；
2. 必要时可进一步对阳性结果进行测序鉴定。
3. M13F：TGTAAAACGACGGCCAGT
M13R：CAGGAAACAGCTATGAC

FAQs

1. 片段载体摩尔比必须是 2:1 吗?

片段载体摩尔比通常可在 1:1~5:1 之间进行设置，推荐 2:1。片段载体摩尔比过大时反而会降低连接效率，比例越大，降低越严重。对于常规单片段，片段:载体=20:1 时连接效率约为 2:1 时的 20%，片段越多，连接效率下降幅度越显著。

2. 片段、载体都必须纯化吗?

为保证最佳效果，建议片段进行杜回收，载体进行胶回收。若片段扩增特异性好且扩增产量较高时，对于 3 片段及以下的连接，可不回收。若载体使用酶切获得，建议回收，以避免酶切缓冲液对转化过程的抑制；若载体使用 PCR 获得，在扩增特异性好且使用 DpnI 进行模板消化后可不回收，否则需回收。

3. DNA Assembly Mix Promax 允许组装的片段数是多少?

DNA Assembly Mix Promax 单次反应最多可组装 15 个片段，但为，但为保证成功率，建议单次组装片段数量不超过 5 个，超过时建议进行分步组装。

4. DNA Assembly Mix Promax 允许组装的最大片段是多少?

目前 DNA Assembly Mix Promax 已测试可高效组装全长 20kb 的重组质粒，更长场景暂无测试数据。

5. DNA Assembly Mix Promax 能够组装≤200 bp 的 DNA 片段吗?

可以。当片段大小≤200bp 时，为达到更好的组装效果，推荐插入片段的摩尔使用量为载体的 5~20 倍。

6. 反应可以在其他温度下进行吗?

最佳反应温度为 50°C，在 30~60°C 范围内也能工作，但效率可能有所下降。

7. 可以用 DNA Assembly Mix Promax 的连接产物作为模板进行 PCR 或 RCA 吗?

可以。组装好的产物是完整的环状序列，可以用于后续的 PCR 或 RCA。

8. 单链 DNA 寡核苷酸片段可以组合在一起，然后与双链 DNA 片段进行组装吗?

可以。但需要确定每种寡核苷酸的最佳浓度，建议使用 45nM 作为初始浓度进行摸索；同时，寡核苷酸数量不应超过 12 种，且彼此之间要有至少 30 个碱基的 overlaps。

9. DNA Assembly Mix Promax 可以组装含 5'和 3'末端的不匹配序列的插入片段吗?

可以，DNA Assembly Mix Promax 允许 5 和 3'末端同源臂外有 530 bp 的不匹配序列，超过此长度时连接效率显著下降。若要组装有更长的不匹配序列的片段，建议使用 DNA Assembly Mix Ultra (REF:D0204P)，其可以组装 5'和 3 末端同源臂外有≤110 bp 不匹配序列的片段。

10. DNA Assembly Mix Promax 连接产物可以用于电转化吗?

可以，但需要使用纯化的片段载体进行连接，未纯化片段或载体引入的 PCR 缓冲液或酶切缓冲液会严重降低电转化效率。电转化可以将转化效率提高几个数量级，通常取 1ul 连接产物用于电转化即可。

11. 制备片段和载体时可以用 TE 进行洗脱和储存吗?

可以，TE 不影响连接效率。

12. 不小心将 DNA Assembly Mix Promax 室温放置后能继续使用吗?

DNA Assembly Mix Promax 经过特殊优化，37°C 储存 16 天无活性下降，故短时间室温放置不影响活性。但长期储存需在-20°C 条件下。

13. DNA Assembly Mix Promax 能用于组装反向重复序列和串联重复序列吗?

不建议，此类序列使用基于 Gibson Assembly 原理的产品进行组装时容易产生错配或丢失，建议使用 Golden Gate Kit 进行组装。