

DNA Assembly Mix Smart

REF: EG26208S

储存条件

-20°C保存 2 年

产品组成

组分	规格
DNA Assembly Mix Smart	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。

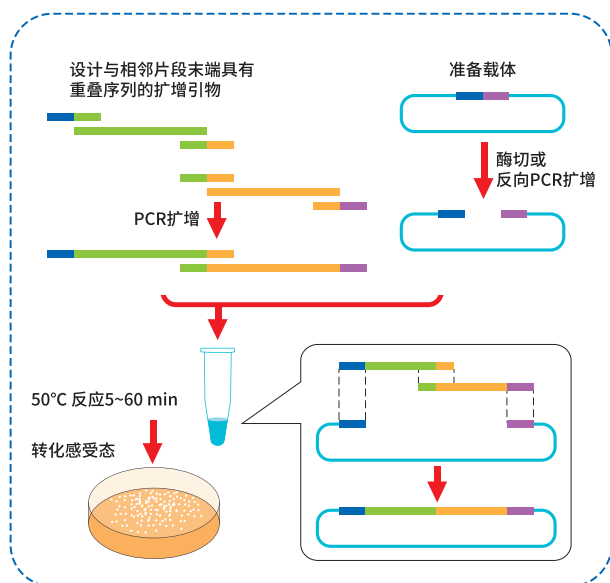
DNA Assembly Mix Smart 单次反应可完成 1~15 个片段的组装，最快仅需 1 min 即可完成单片段重组，且阳性率高于 95%。通过优化缓冲液组分与酶的配比，DNA Assembly Mix Smart 与 DNA Assembly Mix Ultra 相比显著提升了对未纯化 PCR 产物的耐受性及产品稳定性，无惧氧化、冻融影响。此外，DNA Assembly Mix Smart 与 DNA Assembly Mix Ultra 同样使用 HiFi Taq DNA Ligase，连接保真度高。

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，需对载体进行纯化后方可进行重组反应，未纯化的酶切产物会抑制转化。

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：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 LightNing[®] DpnI (货号: EG15585) 1 µl 加入 50 µl PCR 产物中 37°C 1 h, 65°C 5 min 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。

注 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 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'

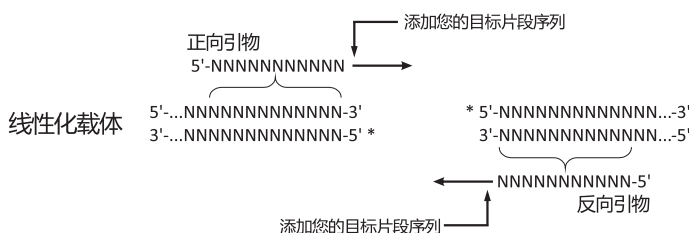
插入片段反向扩增引物：

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：如果最终引物长度超过 40 bp，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：

EcoRI
5'—ATGACCATGATTACGCCA—3' 5'—AATTCAGTGGCGTCGTTTAC—3'
3'—TACTGGTACTAATGCGGTTTCA—5' 3'—GTGACCGGACGAAAATG—5'

HindIII

注 5：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 冰上配置以下反应体系：

组分	反应体系	阴性对照 1 ^a	阴性对照 2 ^a	阳性对照 (如有必要) ^a
DNA Assembly Mix Smart	5 μ l	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	-	10~100 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。

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;

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: 载体用量允许范围为 0.006~0.15 pmol;

注 5: 片段载体摩尔比应控制在 10 以内;

注 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。

注 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°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 片段, 推荐时间 5~15 min, 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;

注 3: 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。

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

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 60 s, 冰浴 5 min。加 500 μ 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 > 10⁶ 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: TGTAACGACGCGCCAGT

M13R: CAGGAACAGCTATGAC

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, 建议片段进行柱回收, 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 Smart 允许组装的片段数是多少？

DNA Assembly Mix Smart 单次反应最多可组装 15 个片段, 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 Smart 允许组装的最大片段是多少？

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

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

可以。当片段大小 ≤200 bp 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 Smart 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 45 nM 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 Smart 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 Smart 允许 5' 和 3' 末端同源臂外有 ≤ 30 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: EG24204)，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 Smart 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 1 μ l 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 Smart 室温放置后能继续使用吗？

DNA Assembly Mix Smart 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 Smart 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。

Trouble shooting

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。
	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。