

Tycontra DNA Assembly plus Mix

【产品简介】 ◇Tycontra DNA Assembly plus Mix是基于同源重组原理开发的一款简单、快速、高效的无缝克隆试剂盒，能够将任意含有载体末端重叠区域的DNA片段重组至线性化载体上，不受酶切位点限制，载体自连背景极低。该方法的实现需要在插入片段正/反向 PCR 引物的 5'端引入线性化载体上的15~25 nt 末端序列，通过重组酶的作用使得具有重叠区域的片段和载体最快在50°C 5 min内重组，完成无缝克隆。

◇本产品可同时实现 1~5 个DNA片段的重组。

【货 号】 P1571

【规 格】 50T (10ul 体系)

【包装清单】	组分	规格
	2×Tycontra DNA Assembly plus Mix	250ul
	pUC19 Control Plasmid Linearized (Amp, 40ng/ul)	5ul
	Control Fragment (500bp, 20ng/ul)	5ul

【保存条件】 -20°C保存，有效期一年。避免反复冻融。

【使用说明】 1、线性化载体的制备

选择合适的克隆区域对载体进行线性化（尽量选择无重复序列且GC含量均匀的区域），线性化的方法有酶切制备和反向PCR扩增制备两种。

1) 酶切制备

推荐使用双酶切使载体线性化更完全，以降低转化背景。使用单酶切线性化载体时，可以适当延长酶切时间以减少环状质粒残留。平末端或粘末端均可，但务必保证酶切完全（可用琼脂糖电泳验证观察）。

2) 反向PCR扩增制备

推荐使用高保真聚合酶（如NEB的Q5、TOYOBO的KOD或Pfu等）扩增减少碱基突变的概率。推荐使用预线性化质粒为模板，以减少环状质粒模板残留对克隆阳性率的影响。当模板为环状质粒时，扩增产物建议用DpnI消化后使用。

2、插入片段的制备

1) 引物设计原则

插入片段扩增引物由两部分构成：重叠区域+特异性引物，即在插入片段的正/反向引物的5'端引入待重组的线性化载体末端15~25nt的序列（建议同源部分长度≥18nt）。

2) PCR 扩增制备

推荐使用高保真聚合酶（如NEB的Q5、TOYOBO的KOD或Pfu等）扩增减少碱基突变的概率。扩增后使得插入片段末端带有和线性化载体末端一致的同源序列。

3、重组反应（推荐/10ul体系）

1) 体系的配制

组分	目的重组	阴性对照 1c	阴性对照 2d	阳性对照 e
2×Tycontra DNA Assembly plus Mix	5ul	5ul	5ul	5ul
线性化载体 (50~200ng) a	X ul	X ul	0	1ul ①
插入片段 (10~200ng) b	Y ul	0	Y ul	1ul ②
ddH2O	Up to 10ul	Up to 10ul	Up to 10ul	Up to 10ul

①pUC19 Control Plasmid Linearized(Amp, 40ng/ul)

②Control Fragment (500bp, 20ng/ul)

a: 最适载体用量 (ng) = $0.02 \times$ 载体碱基对数, 即 0.03pmol;

b: 最适片段用量 (ng) = $0.04 \times$ 片段碱基对数, 插入多片段, 每片段最适用量 (ng) = $0.02 \times$ 片段碱基对数。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; 若插入片段的长度小于 200bp, 则插入片段应使用 5 倍载体用量;

c: 检验线性化载体中是否有背景质粒残留;

d: 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;

e: 用来排除其他操作因素的影响。

2) 反应条件

将上述各个成分轻柔混匀(避免产生气泡, 请勿涡旋操作)按如下条件进行反应:

插入片段数量	反应条件
1~2 个插入片段	50℃, 5~15 min
3~5 个插入片段	50℃, 15~30 min

注: 当载体骨架>10kb 或插入片段>4kb 时, 建议延长反应时间至 30~60min。

3) 转化验证 (参照所用感受态的使用说明)

A、取 100ul 感受态细胞于冰浴上融化, 加入适量重组产物 (体积不超过所用感受态细胞体积的 1/10) 轻轻混匀, 冰上静置 30min;

B、42℃水浴热激 60s, 迅速转移至冰浴中, 静置 2min;

C、向离心管中加入 500ul 不含抗生素的无菌培养基(2×YT 或 LB) 混匀后 37℃ 200rpm 复苏 1h;

D、根据实验需要, 吸取不同体积的复苏液均匀涂布到含相应抗生素的 2×YT 或 LB 培养基上, 将平板倒置放于 37℃培养箱过夜培养。

4) 阳性克隆的鉴定 (根据具体实验要求选用合适的方法, 建议做双重验证)

A、菌落/菌液 PCR 鉴定: 用枪头挑取单菌落至 10ul 无菌水中混匀后取 1ul 为

模板，或直接蘸取菌落至 PCR 体系中扩增（建议至少使用一条通用引物以避免假阳性结果）；

B、以质粒为模板 PCR 鉴定：挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基中 37℃，200rpm 过夜摇菌后抽提质粒作为模板，可使用载体通用引物或特异性引物扩增；

C、酶切鉴定：挑取单克隆至含相应抗生素的 LB 培养基 37℃，200rpm 过夜摇菌后抽提质粒，使用相应内切酶酶切质粒后电泳检测片段大小；

D、测序：建议使用载体通用引物测序鉴定。

【注意事项】

- ◆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；
- ◆酶切完成后，应快速将内切酶失活或对目的产物纯化后再用于重组反应；
- ◆若载体为粘性末端，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；
- ◆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 25nt 区域内 GC 含量为 40% ~60% 时，重组效率最高；
- ◆计算扩增引物 T_m 值时，只需计算特异性引物的 T_m 值，引入的额外序列无需计算。
- ◆若载体片段过长、插入片段过长或片段数过多，克隆阳性率均会降低，此时建议分步进行无缝克隆；
- ◆若某一组分浓度过高可适当稀释，每个组分的用量最好不低于 1ul；
- ◆推荐使用 PCR 仪等温控较精准的仪器反应，反应时间不足或太长克隆效率均会降低；
- ◆50℃ 反应完成后，建议进行瞬时离心，将反应液收集至管底，减少产物损失；
- ◆进行重组后的产物，建议即时转化，避免贮存导致克隆阳性率下降。