

产品简介

产品组成

保存条件

实验流程

应用实例

常见问题与解决方案

1 产品简介

GenRec Assembly Master Mix Kit 是一款简单、快速、高效的多片段 DNA 定向克隆产品，本试剂盒可以将 PCR 产物定向克隆至任意载体的任意位点。做法是：将载体在克隆位点进行线性化，并在插入片段 PCR 引物 5' 端引入线性化克隆载体末端序列，使得插入片段 PCR 产物 5' 和 3' 最末端分别带有和线性化克隆载体两末端对应的完全一致的序列(20 bp ~ 40 bp)。将这种两端带有载体末端序列的 PCR 产物和线性化克隆载体按一定比例混合，在重组酶的催化下，仅需反应 15-60 min 即可进行转化，完成定向克隆。克隆阳性率可达 90%以上。

试剂盒中 2×GenRec Assembly Master Mix 预混了重组酶和重组反应所需缓冲液，并添加了特殊成分，可显著提高重组克隆效率，可以一次实现多至 3-6 个片段的顺序拼接克隆。

产品特点

- 简单，快速
- 无需考虑酶切位点，任何片段可克隆到任何目的载体的任何位置
- 克隆阳性率在 90%以上，降低克隆筛选的工作量
- 插入基因片段不带无关序列，真正的无缝克隆
- 可同时进行最多 6 个 DNA 片段的组装

应用范围

- 快速定向克隆
- 无缝克隆
- 多片段插入和连接
- 快速定点突变，可同时实现多个位点的定点突变

2 产品组成

2×GenRec Assembly Master Mix

Positive control (四个 PCR 片段, 一个线性化载体)

PET-SEQF/SEQR (菌落 PCR 用引物)

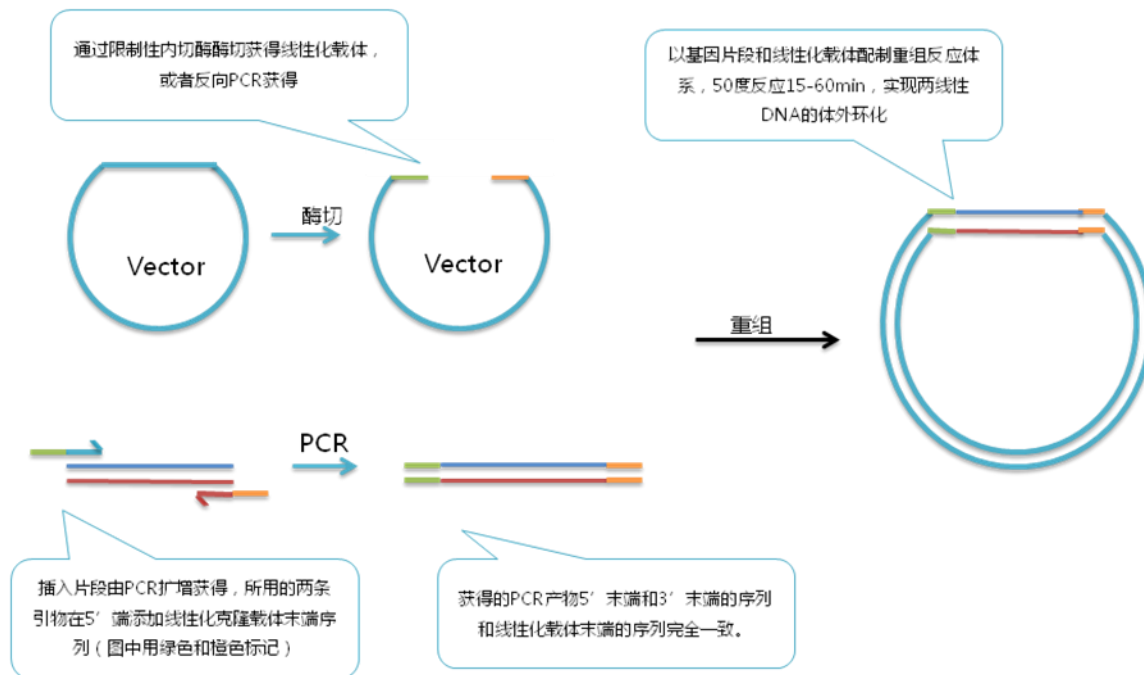
	CL08010	CL08020	CL08050
2×GenRec Assembly Master Mix	100ul	200ul	500ul
阳性对照片段	8ul	8ul	8ul
阳性对照载体	2ul	2ul	2ul
载体引物	20ul	20ul	20ul

3 保存条件

-20°C避光保存 12 个月, 避免反复冻融

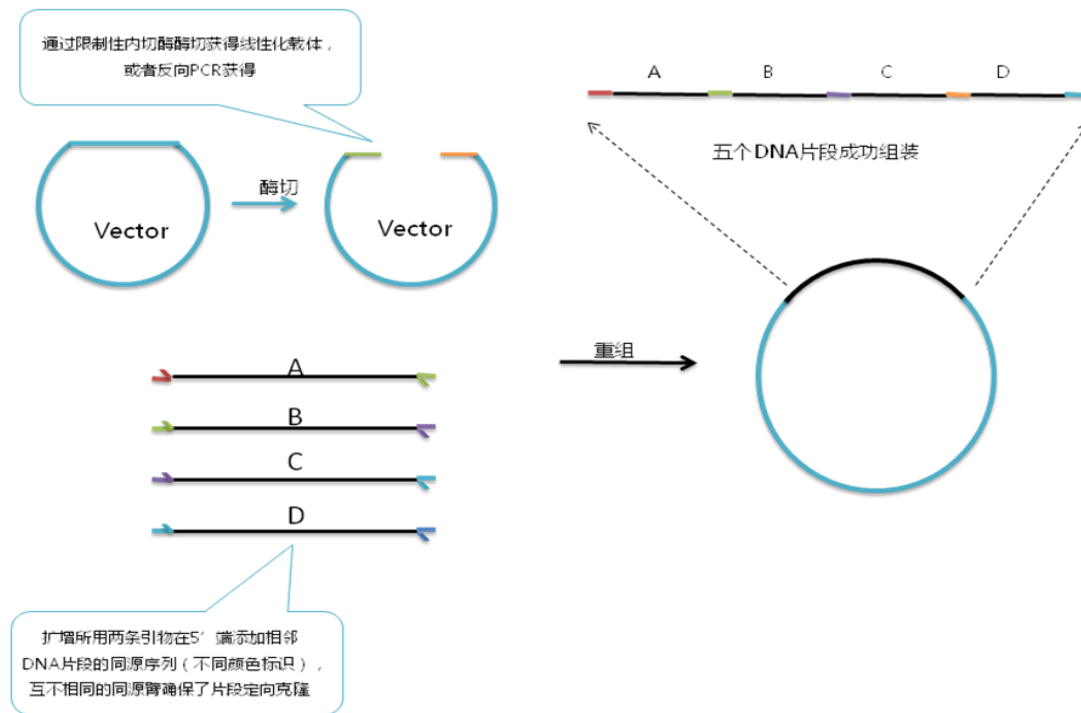
4 实验流程

4.1 单片段重组流程概览



图一：使用 2×GenRec Assembly Master Mix 将一个基因片段克隆到目标载体，实验需要基因片段和线性化载体。该线性化载体可以通过限制性内切酶酶切载体获得，或者用反向 PCR 扩增环状载体获得。插入片段由 PCR 扩增获得，所用的两条引物在 5' 端添加线性化克隆载体末端序列（图中用绿色和橙色标记），这样获得的 PCR 产物 5' 末端和 3' 末端的序列和线性化载体末端的序列完全一致。

4.2 多片段重组流程概览



图二，使用 2×GenRec Assembly Master Mix 将四个基因片段克隆到目标载体。

该线性化载体可以通过限制性内切酶酶切载体获得，或者用反向 PCR 扩增环状载体获得。插入片段由 PCR 扩增获得，所用的两条引物在 5' 端添加同源序列（图中用多种颜色标记），最终使得多个片段能够按照设定的顺序组装进同一载体。例如 A 片段左边红色序列为和载体同源的序列，右端绿色序列为和 B 同源的序列。五种不同颜色的同源序列之间互不相同以确保片段按照既定顺序连接，避免产生错误连接。

4.3 制备线性化载体

重组酶只能利用线性化的载体，因此线性化是克隆成功的前提。获得线性化载体可以通过限制性内切酶酶切或 PCR 反向扩增。

4.3.1 限制性酶切方法

选择合适的克隆位点，并对克隆载体进行线性化。尽可能选择双酶切（而不是单酶切）以减少背景菌落。酶切后通过胶回收的方法纯化 DNA，这样能避免载体两酶之间的片段 DNA 对后续重组实验的干扰。

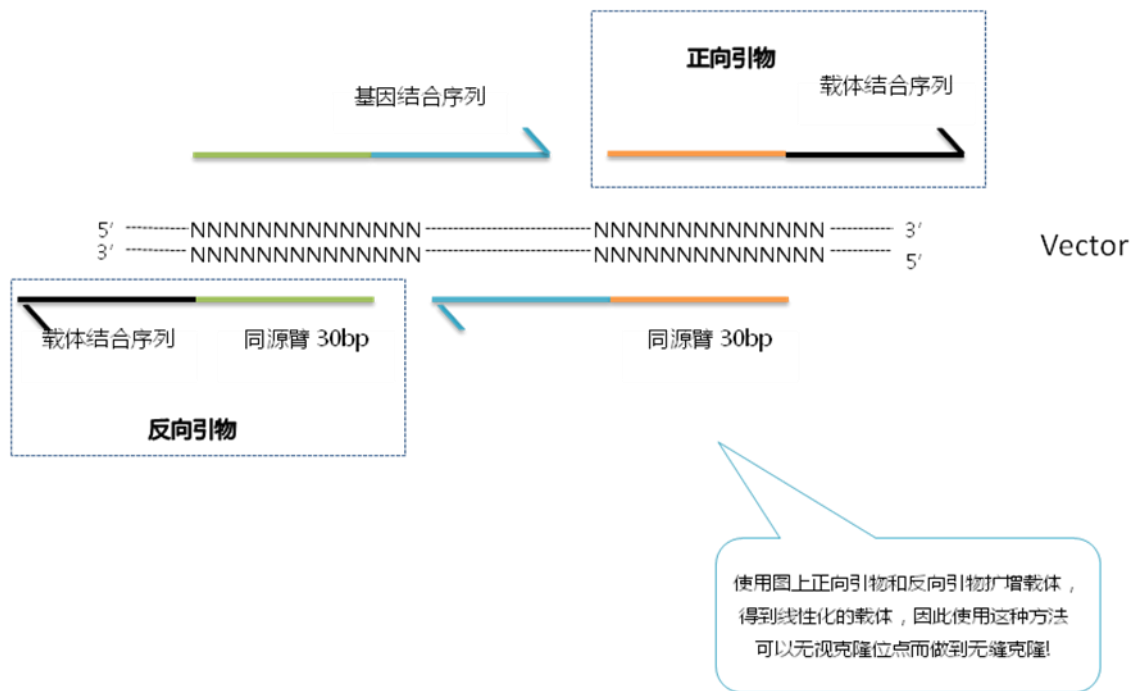
酶切反应的体系，使用 NEB 的限制性内切酶酶切。

反应组分	用量
DNA	2-5ug
Cutsmart	5ul
Enzyme1	5U
Enzyme1	5U
ddH2O	To 40ul

- 酶切 2-3 小时。
- 琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物，配制 0.7% 的琼脂糖凝胶，以 5V/cm 的电压电泳 40min，用琼脂糖凝胶纯化试剂盒纯化线性化的载体 DNA。用 30ul 洗脱液洗脱。
- 检测载体线性化程度：将 10ng 线性化的载体 DNA 转化感受态细胞（效价 1×10^8 cfu/ug）。如果次日平板上的克隆多于 50 个，说明载体线性化不够完全，需要减少质粒用量或增加限制性内切酶量，重新酶切载体。

4.3.2 反向 PCR 方法

制备线性化载体 DNA 的引物设计如下图所示：



PCR 制备线性化载体的关键在于保证 PCR 扩增的保真性和特异性，通常载体序列长达 3kb-8kb 不等，建议使用 Generalbiol 的 2×GPV8 HF Master Mix，8kb 的基因片段扩增并不容易，2×GPV8 HF Master Mix 能够稳定实现 8kb 的基因片段的成功扩增。

扩增的模板最好使用已经酶切线性化后的载体 DNA，而不用环状质粒，这样可以减少残留的模板质粒对后续克隆造成的高背景，低阳性率的可能。因为即使是残留 0.1ng 的质粒，使用正常的感受态细胞也能在平板上长 10^2 - 10^3 个克隆。如果必须使用环状质粒 DNA 作为 PCR 模板，需要在 PCR 结束后用 DpnI 消化甲基化的质粒模板，加 1ul 的 DpnI 限制性内切酶 37 度消化 1 小时，然后再胶回收或柱回收纯化 DNA。

注意：如果 PCR 制备线性化载体时，有非特异性条带的出现，一定要切下目的载体的条带，进行胶回收纯化，才可进行后续实验。

4.4 插入片段的扩增

4.4.1 通过引物设计加入同源序列

重组依赖于克隆载体与插入片段，以及相邻插入片段之间的同源序列 (20-80bp)，通常克隆的基因两端并没有和载体相同的同源序列，需要 PCR 获得有同源序列的基因片段，这是通过引物设计和高保真的 PCR 反应来实现。

如图一所示，通过设计引物，使正反向引物的 5' 端分别带有载体两末端 20-40bp 相同的序列，而引物的 3' 端为和目标基因特异性结合的序列，该区域长度需达到 17-25bp，这样总引物长度为 37-65bp，使用该对引物 PCR 扩增目标基因就可以获得带有同源序列的目标基因。

在设计引物时请遵循以下原则：

- 1、正、反向引物的 5' 端的同源序列和线性化载体两末端序列完全一致。如果使用酶切法制备线性化载体，同源序列包括酶切位点及其临近的核苷酸序列。
- 2、正、反向引物的 3' 端是特异性扩增目的基因必需的，因此要依据 3' 端这一段序列计算引物的退火温度，而不是根据引物全长计算。为保证 PCR 反应的顺利进行，引物的退火温度应选在 55-65°C 之间，两对引物之间的 GC 含量和退火温度应尽可能接近， T_m 值相差要小于 5°C，可以通过改变引物结合位置或调整引物长度实现。
- 3、同源序列的设计非常有必要，尤其是做多个片段组装时，尤其要谨慎设计同源序列，避免同源序列为重复序列，和其他序列重复，或本身具复杂的二级结构，假设同源序列本身形成发卡结构，该片段与下一个片段连接的效率大大降低，导致重组的失败。多个同源序列之间也要不同，如果多个同源序列之间出现 10bp 以上的相同序列，会导致错误重组的发生，最终产生个别片段的缺失。

4.4.2 插入片段的 PCR 扩增

- 1、减少模板量

为了保证克隆反应的高阳性率,减少后期克隆筛选的工作量,在 PCR 扩增基因片段时,应使用尽可能少的 DNA 模板,对于质粒 DNA 模板 1-20ng 即可。如果使用 cDNA 为模板,加入量则取决于目的基因的表达量,

2、 PCR 产物扩增和纯化

如果 PCR 扩增存在难度,可以使用通用生物的 2×GPV8 Master Mix (Cat.No.PE06) 完成复杂模板的扩增。

PCR 反应结束后,应用琼脂糖凝胶电泳确定 PCR 反应成功,如果扩增得到一条清晰、干净的条带,且插入片段小于 4kb,那么只需应用纯化柱回收,以去除 PCR 反应中剩余的酶、反应缓冲液。

如果 PCR 扩增的结果有非特异性扩增条带,则需要凝胶回收纯化分子量正确的片段,以去除剩余非特异性扩增片段对后续实验的干扰。

2×GenRec Master Mix 对于体系中盐离子的耐受性较高,因此 PCR 反应结束的产物也可以直接用来做重组反应,只要先通过电泳检测 PCR 成功扩增了目的基因,而且无非特异性条带,尤其是扩增片段相对较小时(小于 1.5k)。直接用 PCR 产物做重组的优点是能够省去回收纯化的时间,缺点是,但是这样获得的产物保存时间不够长,在有核酸酶污染的情况下可能次日就会被降解,同时直接使用 PCR 产物做重组会一定程度上降低重组效率。当您需要直接使用 PCR 产物做重组时,建议 PCR 产物添加量不超过反应体系的 1/5,即不超过 4ul。

4.4 反应的设置

本试剂盒中包含了 Positive control 样品,可以帮助用火在实验室测试该方法,并对产品进行检测。Positive control 包含了一个 2.6kb 的线性载体 DNA 和 4 个插入片段,分别长 1000bp、1000bp、1000bp、720bp。

1、按照下表在冰上设置重组反应:

反应组分	用量	Positive control
插入片段	20-200ng	2ul
线性化载体	50-200ng	1ul
2×GenRec Assembly Master Mix	10ul	10ul
ddH ₂ O	To 20ul	7ul

GenRec Assembly Master Mix 重组反应体系,最适载体使用量为每线性化片段 0.03pmol,片段和载体摩尔比为 1:1-3:1。该摩尔数对应的 DNA 质量可由以下公式计算获得:

$$\text{载体添加量 (ng)} = 0.02 \times \text{片段碱基数 (bp)} \text{ (对应的片段量为 0.03 pmol)}$$

例如一个 5kb 长的载体 DNA,其最佳使用量为 100ng,插入片段的加入量由以下公式计算:

$$\text{片段添加量 (ng)} = 0.06 \times \text{片段碱基数 (bp)} \text{ (对应的片段量为 0.09 pmol)}$$

2、充分混匀各组分,使用枪头轻柔吸打或旋转,避免产生气泡(请勿剧烈震荡或涡旋混匀,大片段 DNA 容易受剪切力影响)。然后置于 50°C 反应 15-60 分钟。

推荐在 PCR 仪或水浴锅等温度控制比较精确的仪器上反应,单片段重组反应 15-30 分钟即可,在 30 分钟重组效率达到最高。多片段重组(3-5 个片段)需要更长的重组时间以达到最高的效率,通常为 40-60 分钟。

实验验证,重组的反应温度在 48°C-55°C 均可,重组效率上会有微小的差别,推荐使用 50°C。

4.5 反应产物转化、涂板

(1) 取 100ul 化学转化感受态细胞于冰上解冻。

(2) 取上述反应液 10 μL (不超过感受态细胞的 1/10,否则会降低转化效率) 加入到感受态细胞中充分混匀。冰浴 10min。

(3) 将离心管置于 42°C 水浴锅中热激 90s,然后迅速放回冰上,使细胞冷却 2~3min。

(4) 向离心管中加入已预热的无菌 LB(或 SOC)培养液 600μL,37°C 恒温振荡培养 45~60min。

(5) 短暂离心弃上清,吸取 100 μL 的新鲜 LB 培养基重新悬浮,将菌液均匀涂布在含有适当抗生素的平板上。待培养基充分吸收菌液后,将平板倒置,于 37°C 过夜培养。

4.6 克隆鉴定

菌落 PCR

用无菌的枪头或牙签将单个菌落挑至 20~50μL LB 培养基中混匀,直接取 1μL 作为 PCR 模板,使用 2×Taq DNA Master Mix 进行菌落 PCR 实验。

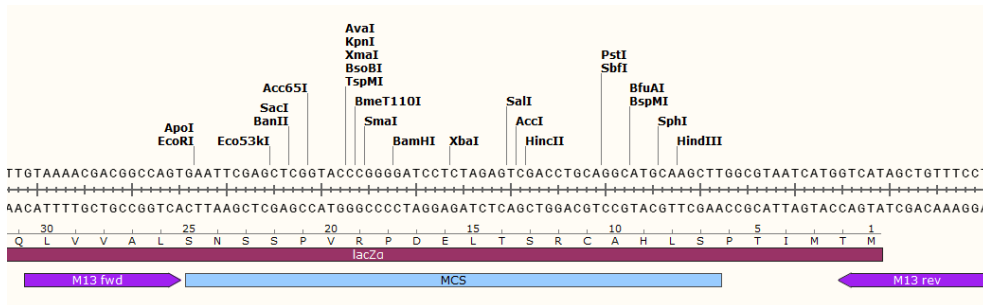
质粒酶切验证

用枪头挑取细菌少许加入含有相应抗生素的 4ml LB 培养液中置于 37°C 过夜,次日进行质粒 DNA 小量提取,然后用限制性酶切的方法判断所选菌落是否为阳性。

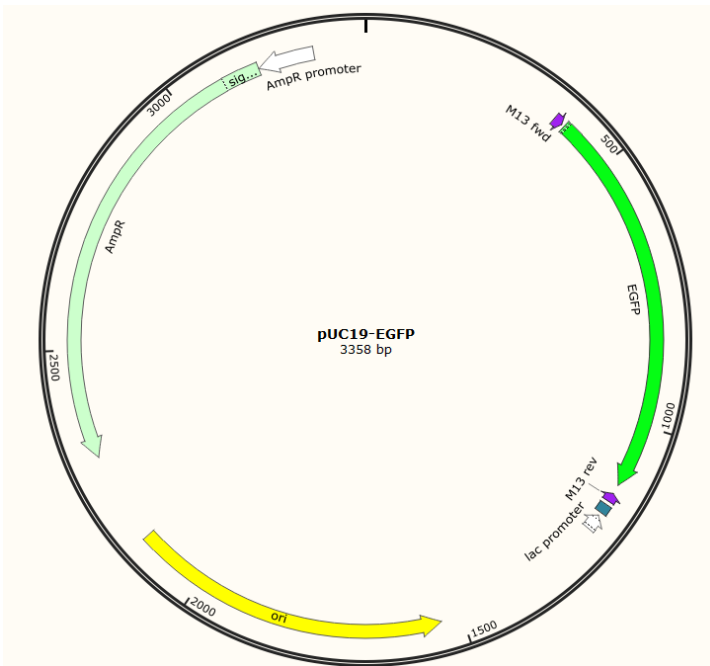
5、应用实例

实例一

实验目的，在 PUC19 克隆载体的 EcoRI 和 HindIII 酶切位点之间加入 EGFP 表达基因
载体克隆 MCS 区域如下：

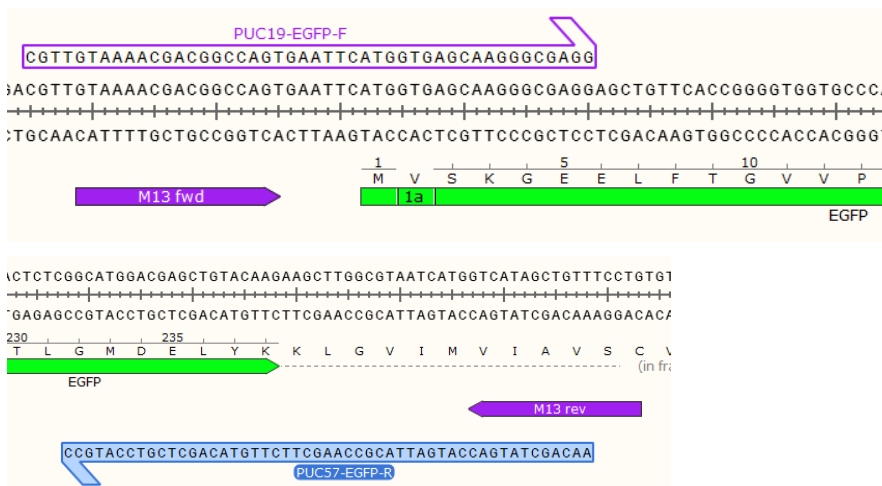


最终构建样式如下



- 用 EcoRI 和 HindIII 双酶切 PUC19 质粒获得线性化载体
- 插入片段 PCR 的扩增引物设计

插入片段 PCR 正、反向引物都包括载体 DNA 同源序列（5'）和插入片段特异性序列（3'）两部分，由于重组片段较少，只有一个片段和一个载体，重组臂相对较短，为 27bp，设计如下图：



- PCR 扩增片段 EGFP

以一个包括 EGFP 报告基因的质粒 DNA 为模板，用上述引物 PCR 扩增插入片段。50ul PCR 体系设置如下：

成分	体积
2×GPV8 HF Polymerase Master	25 μl
PUC57-EGFP-F (10 uM)	1 μl
PUC57-EGFP-R (10 uM)	1 ul
ddH ₂ O	22 μl
PEGFP-N1	10 ng

冰上充分混匀各组分后，进行常规 PCR 扩增，引物 PUC57-EGFP-F 的 T_m 值为 60 °C，PUC57-EGFP-R 的 T_m 值为 58°C，引物退火温度设置为 55 °C，EGFP 基因扩增产物长度为 774bp，按照 2×GPV8 HF Polymerase Master 的扩增速度，15-30s/kb，延伸时间设置为 15s。

温度	时间	
96 °C	5 min	
96 °C	30 cycles	
55°C		30 s
72 °C		15 s
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

反应结束后，取 5ul PCR 产物上样 1%琼脂糖凝胶电泳，可以一条清晰的条带，约为 700bp。

- 测定载体和片段浓度

应用 NanoDrop 测定上述经过纯化的 DNA 产物和线性化载体，所得浓度分别为 45ng/ul 和 50ng/ul

注意：NanoDrop 的测值并不总是客观的，因此建议在做重组反应之前，一定要用电泳法再鉴定自己的 PCR 片段和载体的浓度和纯度，确认回收实验是成功的，我们不能排除回收实验出错的概率，有可能会出现回收前电泳有条带，回收后无条带，或回收后电泳条带弥散的情况。

- 设置重组反应

PUC19 DNA 长约 2.6kb，按照 0.03pmol 的量计算加样量=0.02×2600 bp=52ng (1ul)，计算插入片段的加样量=0.06 ×770 bp=46ng (1ul)，按照下表设置反应：

成分	体积
2×GenRec Assembly Master Mix	10 μl
线性化 Puc19	1 μl
插入片段 EGFP 基因	1 ul
ddH ₂ O	8 μl

冰上充分混匀各组分，放入 50 度水浴锅反应 30 分钟。

- 转化

(1) 取化学转化感受态细胞于冰上解冻。

(2) 取上述反应液 10 μL 加入到 100ul 感受态细胞中充分混匀 (不超过感受态体积的 1/10)，冰浴 10min。

(3) 将离心管置于 42°C 水浴锅中热激 90s，然后迅速放回冰上，使细胞冷却 2 ~ 3min。

(4) 向离心管中加入已预热的无菌 LB(或 SOC)培养液 600μL，37°C 恒温振荡培养 45 ~ 60min。

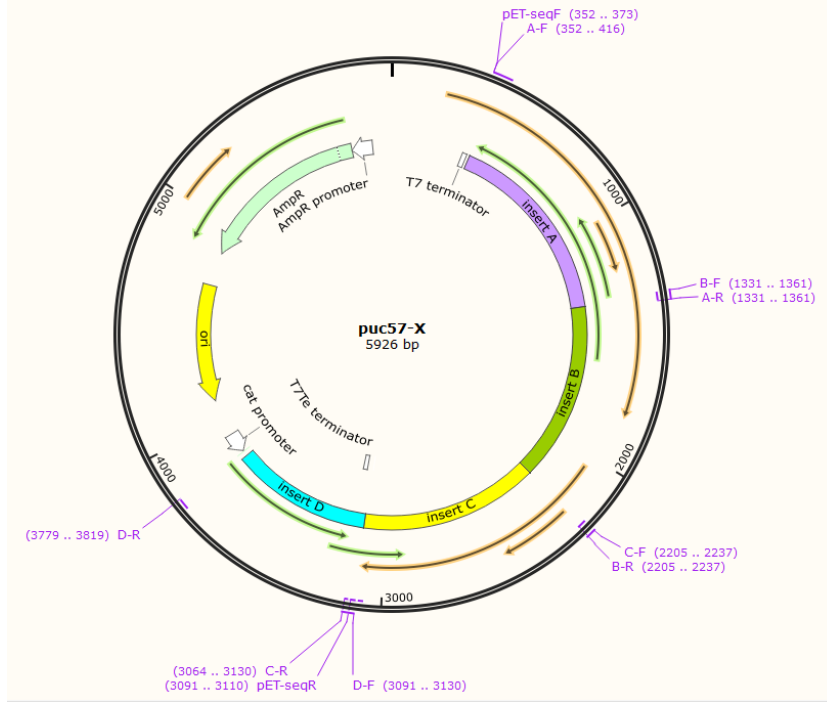
(5) 4000rpm/min 离心 4min，弃上清，吸取 100 μL 的新鲜 LB 培养基重新悬浮，取一半菌液均匀涂布在含有适当抗生素的平板上。待培养基充分吸收菌液后，将平板倒置，于 37°C 过夜培养。

- 克隆鉴定

菌落 PCR。用无菌的枪头或牙签将单个菌落挑至 20 ~ 50μL LB 培养基中混匀 直接取 1μL 作为 PCR 模板 使用 2×Taq DNA Polymerase Master 进行菌落 PCR 实验。

实例二

克隆目的:将序列长度为 3395bp 的 X 基因分为四个不同大小的片段 A、B、C、D 连接入载体 PUC57 中。构建样式如下：



- 用 EcoRI 和 HindIII 双酶切载体质粒获得线性化载体
- 插入片段 PCR 的扩增引物设计

所有的同源序列设计为 40bp，设计如下表：

A-F	GGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGgaattcAGTTACCTGGAGTAGTGTGGCCC
A-R	GATCAAGATCGAGCCGGTTCGAGCACCATCTG
B-F	CAGATGGTGCTCGACCGGCTCGATCTTGATC
B-R	CACGTCATCGTTGTCGAGGGCGCTCAGCAAGGC
C-F	GCCTTGCTGAGCGCCCTCGACAACGATGACGTG
C-R	GCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCC CGAAATTAATACGCCGGCGACGCTG
D-F	CGTATTAATTCGCGGGATCGAGATCTCGATCCTCTACGC
D-R	ATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATC

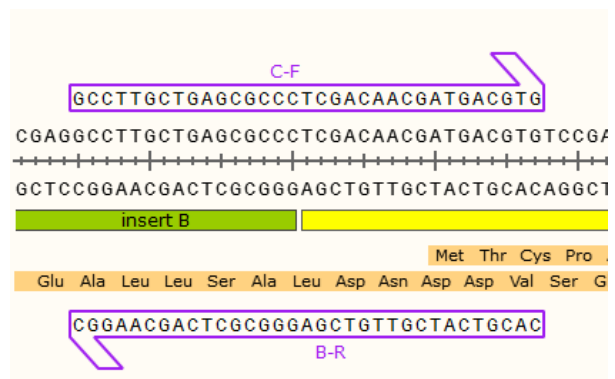
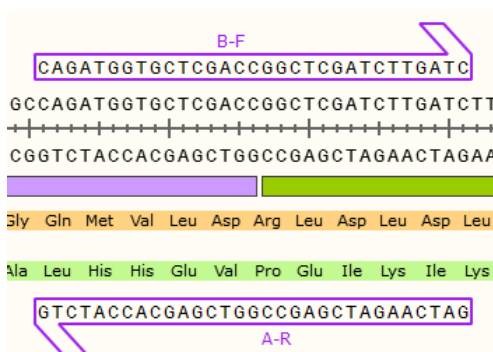
插入片段 A 的正、反向引物 A-F 包括载体 DNA 同源序列，A-R 包括和 B 片段 5' 末端的同源序列；

插入片段 B 的正、反向引物 B-F 包括和 A 片段 3' 末端的同源序列，B-R 包括和 C 片段 5' 末端的同源序列；

插入片段 C 的正、反向引物 C-F 包括和 B 片段 3' 末端的同源序列，C-R 包括和 D 片段 5' 末端的同源序列；

插入片段 D 的正、反向引物 D-F 包括和 C 片段 3' 末端的同源序列，D-R 包括和载体 DNA 末端的同源序列；

设计的同源序列之间互不相同，40bp 的同源序列选择在无重复序列的区域，且自身不形成复制的二级结构（如发卡）。引物设计样式如下：



- PCR 扩增片段 A、B、C、D
以分别包括 A、B、C、D 基因的质粒 DNA 为模板，用上述引物 PCR 扩增插入片段。PCR 体系设置参考案例一
- 测定载体和片段浓度
应用 NanoDrop 测定上述经过纯化的 DNA 产物和线性化载体，A、B、C、D 所得浓度分别为 50ng/ul、50ng/ul、50ng/ul、50ng/ul，线性化载体为 52ng/ul。
- 设置重组反应
按照 0.03 pmol 计算载体加样量=0.02×2600 bp=52ng (1ul)，计算插入片段的加样量=0.06×1000 bp=60ng (1ul)，按照下表设置反应：

成分	体积
2×GenRec Assembly Master Mix	10 μl
线性化载体	1.2 μl
插入片段 ABCD	各 1.2 ul
ddH ₂ O	4 μl

冰上充分混匀各组分，放入 50 度水浴锅反应 60 分钟，多片段反应需要 60 分钟的反应时间。

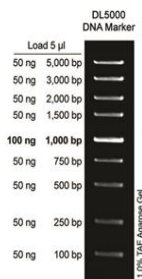
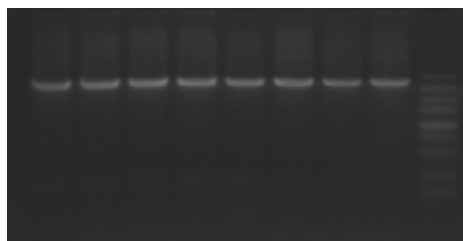
- 后续转化步骤参考案例一
- 克隆鉴定

菌落 PCR

若感受态细胞效价为 1×10^8 ，次日平板上长斑约为 50-200 个，用无菌的枪头或牙签将单个菌落挑至 20~50μL LB 培养基中混匀，直接取 1μL 作为 PCR 模板，使用 2×Taq DNA Polymerase Master 进行菌落 PCR 实验。菌落 PCR 的引物为 PET-SEQF/SEQR，PCR 成功扩增 3.6Kb 的条带就证明克隆为阳性克隆。取菌落 PCR 阳性的克隆摇菌，次日小量提取质粒进行酶切验证，下图为菌落 PCR 图和酶切验证图。从菌落 PCR 图和酶切图中可看出 8 个克隆均为阳性。

pET-seqF GGCCCAAGGGTATGCTAGT

pET-seqR GATCCGCGAAATTAATACG



5 常见问题与解决方案

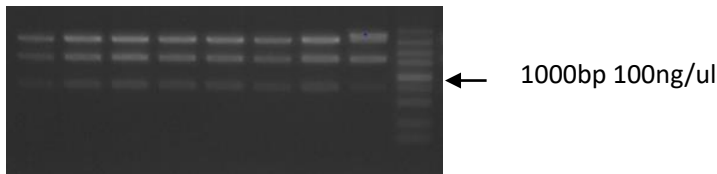
● 平板上长不出克隆或克隆数目少

- 重组方案错误，重新检查片段的引物设计和载体的酶切方法
- 感受态效价低，转化过程出现问题

使用新制备或妥善冻存的感受态细胞，确保转化效率 $> 10^7$ cfu/ug。每次实验可设置一组转化质粒的对照实验，以检测感受态的转化效率。

- 线性化克隆载体或插入片段扩增产物质量不过关，或者比例不佳

尽量按推荐的量和比例配制反应体系。当载体使用量低于 0.01 pmol，或者克隆载体与插入片段的摩尔比超出 2:1-1:5 的范围都会降低克隆成功的效率。所以请在配制反应体系前务必检测线性化载体和插入片段 PCR 产物的浓度。常用的吸光度测量法偏差较大，当浓度低于 20ng/ul 往往不可信，因为吸光度测量极易受 DNA 纯度，溶液的 PH 等因素影响。也可以通过琼脂糖电泳来测定样品中的 DNA 浓度，估测浓度方法如下：



上图中使用的是 DL5000 marker，最亮的条带为 1000bp 条带，浓度为 100ng/ul，以这条带的亮度为标准，可以估算左边酶切条带的浓度，三条带的浓度分别为（从上到下）：200ng/ul，100ng/ul，50ng/ul。

因此，当测值浓度很低时也不代表产物质量很差，使用这样的产物也是可以做好后续克隆的。测值浓度只是个参考。

此外，PCR 产物或酶切产物测值浓度正常，这也不代表产物肯定没有问题，仍然需要电泳进行检测，确定是否存在电泳条带，其条带大小是否正确，回收后是否有杂带或引物二聚体。

- 载体和插入片段中存在抑制反应因素

未纯化的 DNA 加入重组反应体系的总体积不超过 4ul（总体积的 1/5）。载体和 PCR 产物进行胶回收纯化，洗脱液使用 PH=8.0 的 ddH₂O。金属络合物如 EDTA 会影响重组反应，因此请勿用 TE 溶解。

● 多数克隆不含插入片段

- 克隆载体酶切不完全，有残留的环状质粒 DNA，即使只有 0.1ng 的质粒残留，使用效价为 10^8 的感受态细胞转化，也会有上百的质粒转化的克隆。为了降低转化背景，需要提高限制性内切酶用量，延长酶切反应时间，凝胶回收纯化酶切产物，建议配制 0.7% 的琼脂糖凝胶，以 5V/cm 的电压电泳 40min，这样能够将酶切后的电泳条带和质粒条带分离得更彻底，因而也大大减少了回收产物的质粒残留。
- 可能片段基因有毒性，因此有插入片段的克隆无法存活，而剩余的无插入片段的克隆得到了大量的复制。此时需要更换感受态细胞或者采用低温培养的方法来应对插入基因的泄露表达导致的毒性。

● 克隆含有不正确的插入片段

- PCR 产物中有非特异性产物，此时需要优化 PCR 体系，提高特异性，胶回收 PCR 产物。
- 为了得到正确的克隆，需要鉴定更多的克隆。
- 重组臂设计不合理，导致多片段重组时的错误重组。此时需更换方案，重新设计重组臂。

