

EasyFusion Assembly Master Mix

快速重组无缝克隆试剂盒

货号: R40037 Size: 25 rxns

产品介绍

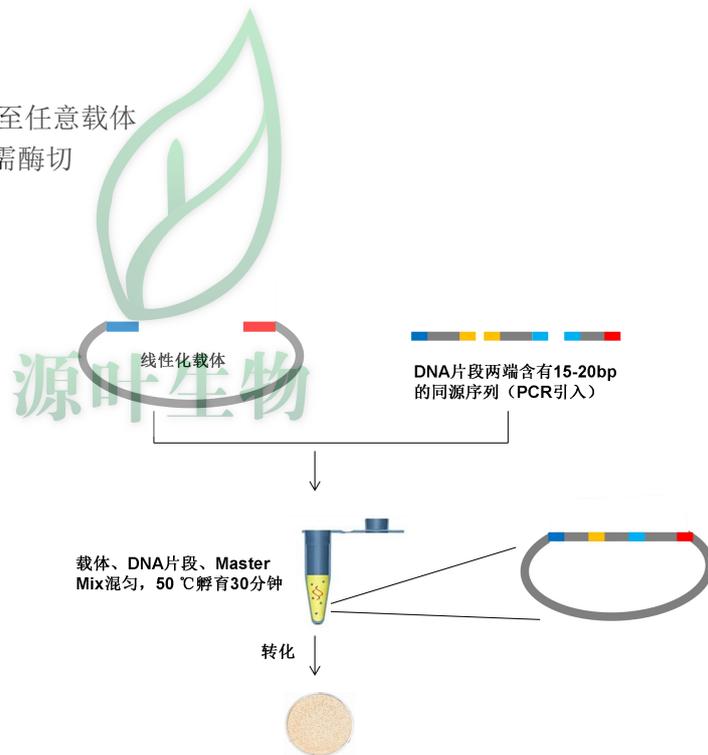
EasyFusion 快速重组无缝克隆试剂盒是一种快速、简单且高效的定向无缝克隆试剂盒，可将目的插入片段一个或多个（PCR 产物）定向克隆到任意载体的任意位置。该技术不依赖于 T4 连接酶、不受载体和目的片段的酶切位点限制。线性化的载体和其两端具有 15-20bp 同源重叠区域的 PCR 片段，在 EasyFusion Master Kit 的混合液中进行反应，仅需 30 分钟即可开始转化。

产品特点

- 简单、高效、快速重组一个或多个片段至任意载体
- 不依赖于连接酶及磷酸酶，PCR 产物无需酶切
- 不依赖于酶切位点
- 可有效克隆 100bp-40kb 的 DNA 片段

操作步骤

- (1) 线性化载体准备
- (2) 扩增插入片段引物设计
- (3) PCR 扩增插入片段
- (4) 重组反应进行
- (5) 反应产物转化、涂板及克隆鉴定



1. 线性化载体准备

可以通过以下两种方法获得线性化载体，最终载体的浓度需 $> 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 。（高浓度的载体有利于提高效率）。

- (1) 选择合适的酶切位点线性化载体。（单酶切或双酶切均可，5'端突出、3'端突出或平末端均适用）
- (2) 以载体为模板，设计引物，通过 PCR 的方式扩增出需要的线性化载体

2. 扩增插入片段引物设计

通常通过 PCR 获得目的片段，引物设计要保证目的片段两端有至少 15bp-20bp 序列与线性化载体的两端一致。PCR 每条引物长度至少在 35-40bp 之间，包括 5'端与载体同源的 15bp-20bp 以及目的片段特异性序列 20-25bp。

注意：如果是表达载体克隆构建，引物设计完后，请注意检查确保读码框的正确；在设计引物时要遵循引物

设计的基本原则，只不过上下游引物要加上 **15-18bp** 的载体同源序列。

3. PCR 扩增插入片段

我们推荐使用高保真聚合酶进行 PCR 扩增插入片段，以减少扩增突变的产生，选择聚合酶时无需考虑末端有无 A 加尾发生（重组过程中将会被去除，在最终载体中不会出现）。PCR 扩增结束后，对目的 PCR 产物进行纯化：若是扩增模板与克隆载体抗性不同，且 PCR 产物条带电泳单一，产物可以无需纯化直接用于重组反应，或者对 PCR 产物进行脱盐等简单纯化；否则，需要进行琼脂糖凝胶电泳回收特异性的目的 PCR 片段。

4. 重组反应进行

取出 EasyFusion Master mix，置于冰浴中，配制如下反应体系（如果不慎将液体粘在管壁，可通过短暂离心沉降）

2X EasyFusion Assembly Master mix	10 ul
线性化克隆载体	10-100 ng
插入片段	20-100 ng
ddH ₂ O	to 20 ul

注意：200 ul 反应体系中，载体和插入片段建议量在 20-50ng 之间，载体与各插入片段的最佳摩尔比为 **1:2-1:3** 轻轻混匀反应体系，50℃ 反应 30 分钟（对于多片段重组或大片段重组，可延长反应时间至 1 小时）；待反应结束后，将离心管置于冰上冷却数秒，之后将重组产物保存于 -20℃ 或之间用于转化。

5. 反应产物转化、涂板及克隆鉴定

建议所使用的感受态细胞效率要达到 $> 5 \times 10^6$ cfu/ug。（可选择 NcmDH5 α 超高效感受态细胞，Cat.No:MD101-1）。

转化步骤按照不同菌种的要求进行或者按平时操作进行即可。菌落长出之后，建议采用菌落 PCR 进行阳性克隆鉴定，或者对样品进行测序确保正确。

保存条件

-20℃ 保存及冰袋运输

注意事项

1. 线性化载体或目的片段的纯化的品质及浓度等较差会显著降低克隆阳性率及克隆数。
2. 随着重组质粒大小的增加（ $>12\text{kb}$ ），克隆效率会显著降低，建议选择稳定性更好的感受态菌种及转化效率更高的感受态细胞。
3. 菌落较少时，建议适当增加重组反应产物的体积量，或者提高转化产物量等。
4. 随着重组片段数目的增加，克隆效率降低，建议增加引物重叠序列长度或适当延长反应时间。