

GenRec Assembly Master Mix Kit

# CL08010	10次	100ul
# CL08020	20次	200ul
# CL08050	50次	500ul

贮存 -20°C避光保存 12 个月，避免反复冻融

概述： 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。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。

应用：

- 多片段克隆到目标载体
- 多片段组装后作为 PCR 或 RCA 的模板

产品组成：

2×GenRec Assembly Master Mix

Positive control (一个插入片段，一个线性化载体 pUC57-EcoRV)

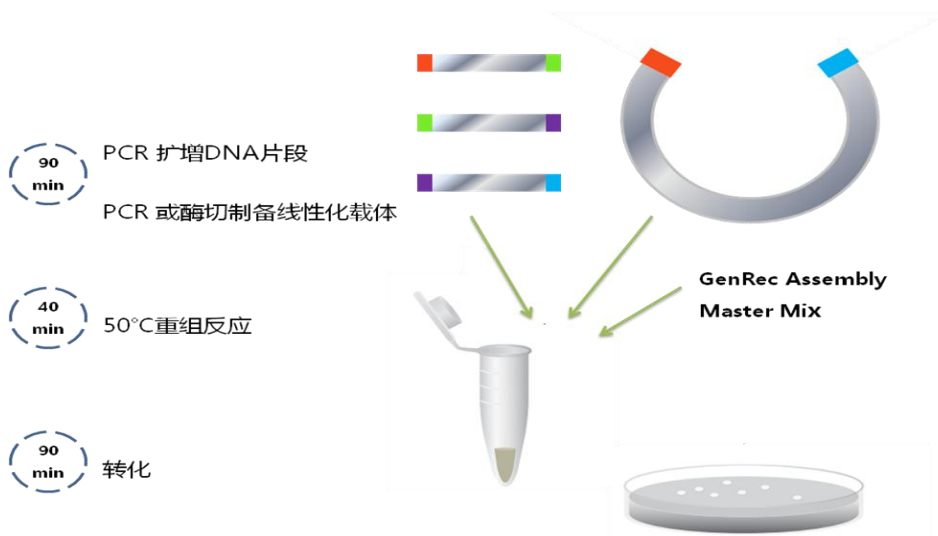
M13F&M13R (菌落 PCR 用引物)

产品特点：

- 简单高效的定向无缝克隆
- 灵活的序列设计，无需考虑酶切位点
- 无需 PCR 纯化步骤
- 可同时进行最多 6 个 DNA 片段的组装

质量控制检测：

使用 Positive control 组装五个 DNA 片段，涂布于 CI 抗性平板上，最终用菌落 PCR 或质粒酶切验证，阳性克隆达到 87.5% 及以上。



使用说明

1、反应体系

冰上配制如下反应体系。

2×GenRec Assembly Master Mix	10 μL
线性化克隆载体	A ng
插入片段 (PCR 扩增产物)	B ng
ddH ₂ O	Up to 20μL

注：如果不慎将液体粘在管壁，可通过短暂离心使其沉入管底。

GenRec Assembly Master Mix 重组反应体系最适 DNA 使用量为每线性化片段 0.03pmol。该摩尔数对应的 DNA 质量可由以下公式计算获得：

$$\text{片段添加量 (ng)} = 0.02 \times \text{片段碱基对数 (bp)} \quad (\text{对应的片段浓度为 } 0.03 \text{ pmol})$$

2、重组反应

(1) 在冰上解冻 2×GenRec Assembly Master Mix，颠倒混匀。

(2) 在无菌管中加入载体和片段（按上述要求），用无菌水补足到 10μL，最后加入 10 μL 2×GenRec Assembly Master Mix，用移液器轻轻吸打混匀避免气泡产生。

(3) 50°C 恒温反应 15-50min，2-3 个片段 15min 反应即可，4-6 个片段需反应 60min，在冰上放置 3-5min。

3、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。将平板倒置，于 37°C 过夜培养。

4、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。

注意事项

- 为达到最优的重组效果，请保证体系中 PCR 片段和载体的质量，建议 DNA 样品 A_{260/280}>1.8，浓度>40ng/ul。
- 多片段重组时，相邻两个 DNA 片段有互不相同的 20-40bp 同源序列，确保定向组装。同源序列的长度由片段数目和长度决定，多片段重组建议设计 40bp 同源序列。同源序列需要避免重复序列、复杂二级结构以及高低 GC 区域。
- 当得到的 PCR 产物条带单一时，可无需纯化，产物可直接用于重组。
- Positive control 为 1 个 1000bp 的片段，载体为 2700bp，氨苄青霉素抗性显色平板。平板上的克隆用 M13F&M13R 引物进行菌落 PCR，成功扩增 1.1k 左右的条带即为正确克隆。
- EDTA 等金属离子螯合剂对该产品有抑制作用，必须保证反应体系中不含该类螯合剂。