

Biomarker MultiF Seamless Assembly Mix

目录: RK02003

规格: 50 RXN (20 μ L / RXN)

浓度: 2 $\times$

产品组成:



Biomarker MultiF Seamless Assembly Mix

RM02111

产品概述:

Biomarker MultiF Seamless Assembly Mix是一种简单、快速高效的DNA无缝克隆技术,可将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。将载体进行线性化,在插入片段正/反向PCR引物5'端引入线性化载体的末端序列,使得PCR产物5'和3'最末端分别带有和线性化载体两末端一致的同源序列(Overlaps, 15~25 bp) (Fig1)。这种两端带有载体末端序列的PCR产物和线性化载体按一定比例混合后,在特定酶混合物的催化下,50 $^{\circ}$ C反应15~60 min即可进行转化,完成定向克隆 (Fig1)。

Biomarker MultiF Seamless Assembly Mix 作为新一代的无缝克隆试剂,专门针对多片段无缝组装反应进行优化,可以一次实现多至5个插入片段的特定顺序组装克隆。使用该试剂,无需考虑插入片段自身携带的酶切位点。2X预混液包含高度优化的反应缓冲液及增强的酶混合物,可显著提高片段无缝组装效率与对杂质的耐受度,使得线性化载体与插入片段不进行纯化直接用于无缝克隆成为可能,极大的简化了实验步骤。无缝组装后的产物是完全封闭的双链DNA产物,可直接用于下一步PCR、RCA 或其它分子生物学操作 (例如转化入感受态细胞)。该方法可成功组装包含15~80 bp末端一致序列的片段,可以组装长达上百kb的DNA片段。

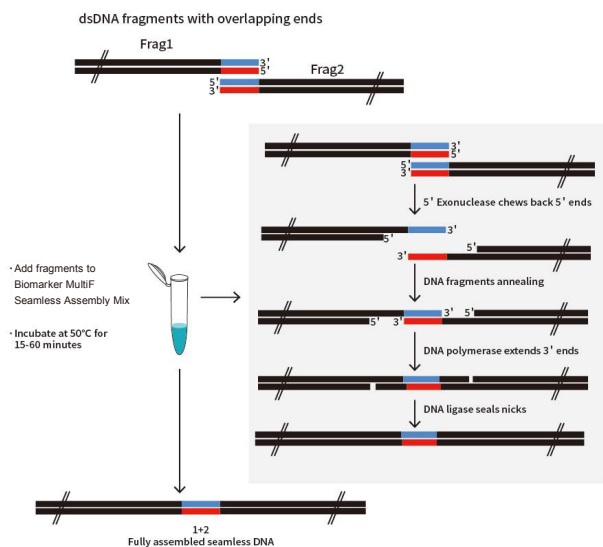


Figure 1: Biomarker MultiF Seamless Assembly Mix方法原理图示

1 产品组成及保存条件:

置于-20 $^{\circ}$ C保存,完全解冻并摇匀,置于冰上备用,使用过程中避免反复冻融。

2 产品应用:

- 快速克隆;
- 高通量克隆;
- 无缝克隆;
- DNA定点突变。

3 自备材料

- 制备含Overlaps片段的模板和引物、线性化载体。
- DNA聚合酶 (用于制备含Overlaps片段)。
- DpnI (去除PCR产物中的甲基化DNA模板)。
- 感受态细胞:
常规克隆,质粒大小<15 kb,推荐使用DH5 α Competent *E.coli*或其他等效感受态细胞;
大片克隆,质粒大小>10 kb,推荐使用XL10 Competent *E.coli*或其他等效感受态。
- 其他材料:
ddH $_2$ O, PCR管, PCR仪, 带对应抗性的LB平板。

4 实验流程概要

- 设计引物,使用高保真DNA聚合酶扩增含Overlaps序列的DNA片段 (或载体);
- 高保真DNA聚合酶扩增或酶切法制备线性化载体;
- 琼脂糖胶电泳、Nanodrop仪或其它方法对DNA片段浓度定量;
- 将适量的DNA片段加入到Biomarker MultiF Seamless Assembly Mix中,根据组装片段的数量,将混合物在50 $^{\circ}$ C孵育15 min至1 hr;
- 反应完成后,将组装产物直接转化*E. coli*或用于其它应用。

5 实验步骤

5.1 线性化载体制备

- 选择合适的克隆位点,对载体进行线性化。推荐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20 bp区域内GC含量均在40~60%时,组装效率将达到最大。
- 载体线性化方式:可以选择限制性内切酶酶切,或反向PCR扩增。

酶切法制备线性化载体:推荐双酶切法使载体线性化完全,降低转化背景(假阳性克隆)。若使用单酶切线性化,请适当延长酶切时间以减少环状质粒残留,降低转化背景;

反向PCR扩增制备线性化载体:载体引物设计举例详见Fig 2b, 50 μ L的PCR反应体系中,推荐使用0.1~1 ng环状质粒模板,或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。

5.2 含Overlaps DNA片段制备

- MultiF Seamless Assembly Mix引物设计的总原则:

在引物5'端引入同源序列,使扩增产物之间、扩增产物与线性化克隆载体之间都含有能够同源组装的Overlaps序列 (15~25 bp)。若手动设计,可参照以下实例:在pUC19载体的EcoRI和HindIII酶切位点间(2.7 kb)插入两段基因,长度分别为0.5 kb、1.0 kb的插入片段 (Fig 2a)。引物具体设计方案如下:

- 其中,两侧片段与载体组装端的引物设计方式为 (Fig 2b):
最上游片段正向扩增引物: 5'-上游载体末端同源序列 + 酶切位点(可保留或删除) + 基因特异性正向扩增引物序列-3'
最下游片段反向扩增引物: 5'-下游载体末端同源序列 + 酶切位点(可保留或删除) + 基因特异性反向扩增引物序列-3'
- 基因特异性正/反向扩增引物序列即常规插入片段正/反向扩增引物序列, T_m 值60~65 $^{\circ}$ C为佳;
- 上/下游载体末端同源序列即线性化载体最末端序列(用于同源组装), GC含量40~60%为佳。
- 中间各插入片段之间的引物设计方式有以下三种:
 - 以前一片段3'端15~25 bp 作为同源序列添加至后一片段5'端;
 - 以后一片段5'端15~25 bp 作为同源序列添加至前一片段3'端 (如图Fig 2c所示);
 - 两片段各取一部分作为同源序列(共计15~25 bp), 分别添加至另一片段末端。
- PCR扩增含Overlaps DNA片段:
含Overlaps的DNA片段可使用任意PCR聚合酶 (Taq酶或高保真酶) 扩增,无需考虑PCR产物末端有无dA尾 (组装过程中将被去除,在最终载体中不会出现)。但为了减少扩增突变的引入,推荐使用高保真聚合酶进行扩增。

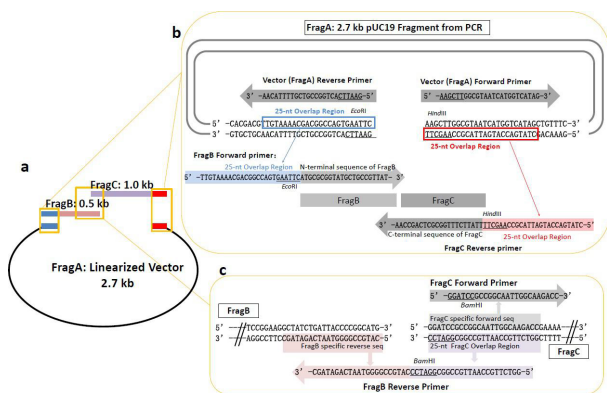


Figure 2: 2.7 kb pUC19载体和0.5 kb、1.0 kb两个插入片段的引物设计方案。

5.3 DpnI去除甲基化PCR模板 (可选步骤)

当PCR反应中需要使用甲基化DNA模板时，推荐用DpnI酶切PCR产物以去除该模板。DpnI只消化被*E. coli* Dam甲基化酶甲基化的质粒DNA，而不切割未甲基化DNA。

DpnI消化步骤：

- 10 μL反应体系中，包含5~8 μL的PCR产物，1 μL的10X CutS反应液及1 μL (20 U) DpnI酶；
- 37 °C反应30 min；
- 80 °C加热20 min使DpnI酶失活；
- 用于下一步MultiF Seamless Assembly实验操作。

5.4 线性化载体与插入片段的最佳使用量

Biomarker推荐：若1~2个片段插入到载体，推荐用0.02~0.5 pmol DNA总量(包含所有片段和载体的DNA总量)；若4~6个片段组装，推荐用0.2~1.0 pmol DNA总量(包含所有片段和载体的DNA总量)。随着组装片段的数量或长度增加，组装效率会降低。可根据片段的长度和质量来计算得到每个片段的pmol数，推荐以下计算公式：

$$\text{pmol} = (\text{质量ng}) \times 1,000 / (\text{碱基数} \times 650 \text{ Da})$$

50 ng 5000 bp dsDNA约为0.015 pmol
50 ng 500 bp dsDNA 约为0.15 pmol

5.5 组装反应

- 在冰上按下表配制反应体系：

试剂	体积	
	2~3 片段组装	4~6片段组装
DNA总量	0.02~0.5 pmol*	0.2~1 pmol
	X μL	X μL
Biomarker MultiF Seamless Assembly Mix	10 μL	10 μL
ddH ₂ O	10-X μL	10-X μL
总体积	20 μL**	20 μL**

* 插入片段的总pmol量是载体pmol量(载体最佳用量为50~100 ng)的三倍时，克隆效率可以达到最佳。当插入片段小于200 bp，插入片段的总pmol量应该大于载体pmol量的五倍。使用未纯化的PCR片段时，加入体积不得超过总体积的20%。

**如果更多片段用于组装，要加入更多体积的MultiF Seamless Assembly Mix。

- 推荐反应条件如下：

组装实验	2~3 片段组装	4~6片段组装
反应温度	50 °C	50 °C
反应时间	15 min	60 min

注意：一般情况下反应时间不要超过60 min，反应结束后置于冰上，立即转化。某些情况下，反应时间越长，效率越高，但不能超过60 min。若不能及时转化，置于-20 °C长期保存。

5.6 组装产物转化

- 在冰上解冻克隆用的感受态细胞(如：DH5α Competent *E. coli* Strain)；
- 取5 μL组装产物加入到100 μL感受态细胞中，轻弹管壁混匀(请勿振荡混匀)，冰上静置30 min；
- 组装产物转化体积不应超过所用感受态细胞体积的1/6；
- 42 °C水浴热激45 s后，立即置于冰上冷却2~3 min；
- 加入900 μL SOC或LB培养基(不含抗生素)，37 °C摇菌1 hr (转速200~250 rpm)；
- 将相应抗性的LB平板在37 °C培养箱中预热；
- 5,000 rpm离心5 min，弃掉900 μL上清，重悬菌体，用无菌涂布棒在含对应抗性的平板上轻涂均匀；
- 37 °C培养箱中倒置培养12~16 hr。

5.7 组装产物鉴定

- 过夜培养后，平板上形成数百个单克隆，而阴性对照转化的平板上克隆数应显著少于前者；
- 挑取若干单克隆进行菌落/菌液PCR鉴定，扩增引物至少使用一条载体上的通用测序引物。如果克隆正确，应有长度略大于插入片段大小的条带出现。也可提取质粒，用酶切或一代测序的方法鉴别。

6 注意事项

为了保证成功的组装和转化，Biomarker提醒注意以下操作事项：

- 细胞：各种感受态细胞的转化效率可能差好几个数量级；克隆的成功率直接与感受态的转化效率相关。
- 电转：电转可以使转化的效率提高好几个数量级。当使用MultiF Seamless Assembly Mix组装产物进行电转时，必须将产物用水稀释三倍后，再取1 μL稀释产物(适用于50 μL电转感受态细胞)用于转化。
- DNA：若使用的PCR产物体积小于MultiF Seamless Assembly反应总体积的20%，则PCR产物不需纯化即可直接使用。若使用的PCR产物体积过高，因为过量的PCR反应液和残留的引物影响，会降低MultiF Seamless Assembly组装效率和转化效率。纯化PCR产物后可以将MultiF Seamless Assembly组装和转化效率提高2~10倍。因此，当组装片段大于3个或组装片段长度大于5 kb时，我们强烈推荐对PCR产物进行纯化。纯化后的DNA产物可溶于ddH₂O、TE或其他低EDTA的稀释液中。
- 插入片段：当直接将片段组装入克隆载体时，插入片段的摩尔量应该是载体的2~3倍。若组装3个以上片段时，推荐插入片段与载体使用相同摩尔量。
- 生物学因素：一些DNA结构，例如反向或串联重复序列，会被*E. coli*选择性排斥。有一些重组蛋白可能具有一定的细胞毒性，*E. coli*不能很好的耐受这些蛋白。这些原因都会导致很少量的克隆或者很小的菌落。

7 常见问题及解决方法

引物如何设计？

- 载体的线性化方式有三种：双酶切、单酶切、反向PCR，优先选择反向PCR。
- 引物三部分：同源臂(15~25 bp，GC含量40~60%) + 酶切位点(根据实验需求保留或者删除) + 特异性引物(引物T_m值的计算不包括同源臂的序列)。

平板上未长出克隆或克隆数目很少。

- 引物设计不正确：引物包含15~25 bp同源臂，GC含量40~60%。
- 线性化载体和插入片段的PCR产物使用量不足/过量，或者比例不佳：尽量按照说明书中推荐的量和比例配制组装反应体系。
- 载体和插入片段不纯，抑制反应：未纯化DNA使用体积不应超过4 μL (不超过反应总体积的20%)；建议线性化载体、PCR产物进行凝胶回收纯化，纯化产物溶于ddH₂O中。
- 感受态细胞效率低：感受态细胞的转化效率应大于10⁷ cfu/μg。可进行简单检测，转化1 ng pUC19质粒，取1/10进行涂板，生长1000个菌斑，估算转化效率为10⁷ cfu/μg；组装产物的转化体积不应超过感受态细胞体积的1/6，否则会降低转化效率；选择克隆用感受态细胞(如DH5 α/XL10)，不能选择表达感受态细胞。

多数克隆不含插入片段或含有不正确的插入片段。

- PCR产物中含有非特异扩增产物：优化PCR体系，提高特异性；胶回收PCR产物；鉴定更多的克隆。
- 克隆载体线性化不完全：可通过阴性对照检测载体是否线性化完全，优化酶切体系，提高限制性内切酶使用量、延长酶切反应时间、胶回收纯化酶切产物。
- 反应体系中混入了相同抗性的质粒：PCR扩增模板为环状质粒时，如扩增产物未纯化直接用于组装反应时推荐DpnI酶切，或者对扩增产物进行切胶回收纯化。

菌落PCR无条带。

- 引物不正确：推荐使用载体的通用引物进行鉴定，或至少使用一条通用引物。
- PCR反应体系或程序不合适：没有目的条带也没有空质粒条带，建议优化PCR体系、程序；或者提取质粒，以质粒做模板PCR验证；或者进行酶切验证。
- 组装失败：只有空质粒的条带，说明组装不成功，载体线性化不完全，建议优化酶切体系。

8 Q&As

可以组装多大的片段？

MultiF Seamless Assembly Mix可以将5 kb的片段组装入15 kb的载体中，总长度高达20 kb。

一次反应可以最多组装多少个片段？

一次反应可以组装的DNA片段数量依赖于片段的长度和序列。MultiF Seamless Assembly已经被证明可以成功将12个0.4 kb片段一次性插入载体中。但是我们推荐一次反应不要超过5个插入片段，以保证插入片段正确组装产生阳性克隆。若多个片段一次反应组装失败，我们建议分成几步组装，降低单次反应的组装片段数量。

能够使用的最短Overlaps长度是多长？

当使用12 bp同源序列时，能够得到高效的组装结果，但是这依赖于同源序列的GC含量。我们推荐使用16 bp或更长的同源序列，同源序列的 T_m > 48 °C (AT pair = 2 °C and GC pair = 4 °C)。

能够使用的最长Overlaps长度是多长？

MultiF Seamless Assembly Mix 中的外切酶活性是针对≤100 bp的同源序列长度优化的。

能够组装≤200 bp的dsDNA片段吗？

可以。当片段大小≤200 bp时，为了更佳的效果，推荐插入片段使用量为载体的五倍以上。

可以使用更长或更短的反应时间吗？

可以。当组装2~3个片段时，15分钟的反应时间已经足够。当组装4~6个片段时，推荐60分钟的反应时间。通常情况下不推荐反应时间小于15分钟。在某些情况下，更长的反应时间可能适当的提高组装效率，但是不能超过4小时。切勿使用MultiF Seamless Assembly反应过夜。

反应可以在其他温度下进行吗？

在50 °C反应时最佳，但是在40~50 °C也能工作。

可以使用由重复His-tag编码组成的15 nt的同源序列(例如CACCACCACCACCAC)吗？

不可以，在His-tag重复密码子后，必须加上与His-tag重复密码子不同的至少3个碱基，并且在同源序列末端要避免重复序列。

组装2~3个片段和组装4~6个片段有什么区别吗？

两者最主要的区别在于两个相邻片段间的同源序列的长度和组装反应的孵育时间。带15~25 nt 同源序列的2~3个片段组装，我们推荐用15分钟的反应时间。带20~80 nt 同源序列的大于6个片段组装，我们推荐60分钟的反应时间。4~6个片段所需的DNA总量也要高于2~3个片段。

可以用MultiF Seamless Assembly的产物来做模板，做后续的PCR吗？

可以。组装好的产物是完整的序列，可以用做后续的PCR扩增。若最终的产物是个闭合的环形DNA分子，那么MultiF Seamless Assembly产物也可以作为Rolling-Circle Amplification (RCA)的模板。

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。但是要优化好每条寡核苷酸加入的量。我们推荐每条寡核苷酸起始使用浓度为45 nM。