

Fast DNA Assembly Mix

【产品内容】

组 分	E0201S (50 rxn)	E0201L (100 rxn)
Fast DNA Assembly Mix	250 μ L	500 μ L

【储存条件】

-20°C保存。

【产品简介】

本产品可以高效、准确的组装 DNA 片段，从而实现简单快速的无缝克隆。该产品可以在一管内，恒温条件下，有效的连接多个带有重叠序列的片段，广泛应用于基因的快速定向克隆，实验过程涉及的反应机理如下：

- (1) 利用外切酶活性产生单链 3' 突出端，促使互补的末端重叠序列 (15-20 bp) 退火；
- (2) 互补末端一旦退火完成，聚合酶活性会沿 3' 延伸填补退火片段的缺口；
- (3) 缺口补平后，利用 DNA 连接酶的连接酶活性完成 DNA 切割处的修复，形成完整的重组载体。

整个过程只需在 50°C 下反应 5-15 min 即可完成，一次反应可兼容 1~5 个片段的同源重组，内含高保真 DNA 聚合酶和高保真 DNA 连接酶可确保重组准确进行，连接产物可进行多种化学感受态大肠杆菌的转化，阳性率接近 100%。

【产品应用】

单片段 / 多片段快速克隆、DNA 定点突变

【操作方法】

1. 重组反应

1) 配制反应体系如下：

组分	重组反应	阳性对照
灭菌水	up to 10 μ L	up to 10 μ L
Fast DNA Assembly Mix	5 μ L	5 μ L
插入片段 ^[1]	Y1+Y2...+Yn μ L	1 μ L
线性化载体 ^[1]	X μ L	1 μ L

[1] 线性化载体及插入片段的推荐使用量：

插入类型	最适载体使用量 (ng)	最适插入片段使用量 (ng)
单片段重组	0.02 \times 克隆载体碱基对数	0.04 \times 插入片段碱基对数
多片段重组	0.02 \times 克隆载体碱基对数	0.02 \times 插入片段碱基对数

2) 重组反应

反应温度为 50°C，其中单片段重组反应 5min 即可，多片段重组反应需要延长至 15min。

2. 连接产物转化

- 1) 将克隆用的化学感受态细胞置于冰上解冻。
- 2) 取 5 - 10 μ L 连接产物加入到 100 μ L 感受态细胞中，轻弹管壁混匀 (请勿振荡混匀)，冰上静置 30 min。注意：连接产物转化体积最多不应超过所用感受态细胞体积的 1/10。
- 3) 42°C 水浴热激 60 sec 后，立即置于冰上冷却 4-5 min。
- 4) 加入 900 μ L SOC 或 LB 液体培养基 (不添加抗生素)，37°C 摇菌 1 h (转速 200 - 250 rpm)。
- 5) 将相应抗性的 LB 固体培养基平板在 37°C 培养箱中预热。
- 6) 5000 rpm 离心 5min，弃掉 900 μ L 上清。用剩余培养基将菌体重悬，用无菌涂布棒在含有正确抗性的平板上轻轻涂匀。
- 7) 37°C 培养箱中倒置培养 12 - 16 h。

3. 阳性克隆鉴定

菌落 PCR 鉴定；酶切鉴定；测序分析。