

快易无缝克隆预混液

NEB # M5522S/L

10/50 reactions

V1.2 2026/02/10

目录

概述 1

组装操作说明 1

感受态细胞转化操作说明 3

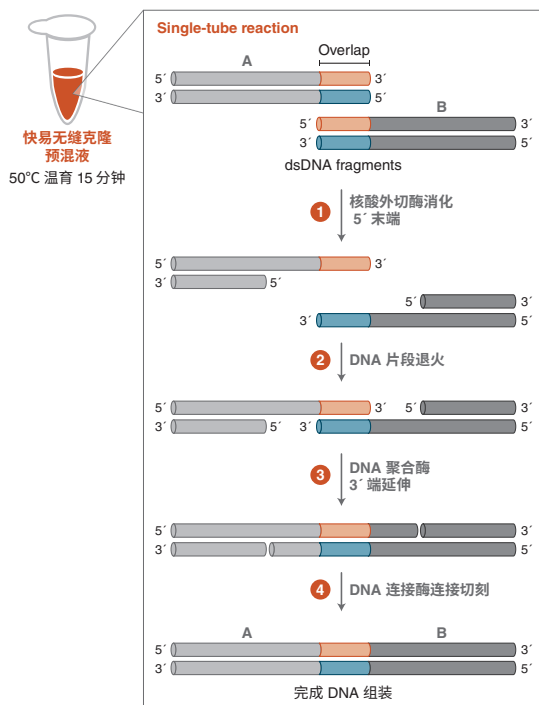
常见问题解答 4

订购信息 6

概述

快易无缝克隆预混液基于 Gibson Assembly 原理开发，可在等温条件下，通过一管式反应，快速高效组装 2-3 个带有重叠末端的 DNA 片段 (图 1)。

图 1. Gibson 组装原理概述



组装引物设计

设计含同源臂的组装片段引物，我们推荐使用 NEB 免费线上设计工具：NEBuilder® Assembly Tool (<https://nebuilder.neb.com/>)，或参考如下设计方案。

重组克隆引物设计通用建议

为实现 PCR 片段与载体的高效组装，我们建议引物的重叠区域长度为 15–25 个核苷酸 (nt)、 T_m 值 $\geq 48^\circ\text{C}$ (假设 $A/T=2^\circ\text{C}$, $G/C=4^\circ\text{C}$)。为防止引物设计错误，强烈建议首先软件模拟进行 DNA 片段组装，并生成一个显示双链 DNA 的最终序列文件 (图 2, 步骤 I)。以此作为模板来设计重叠引物。

图 2 展示了软件模拟生成的 DNA 序列文件进行重叠引物设计的工作流程。首先，标记载体 - 插入片段之间的连接处 (步骤 II)。接着，在每个连接处或其附近，选择 15–25 个核苷酸的序列作为两个相邻片段之间的重叠区域 (步骤 III)。为获得长度和 T_m 值的最佳匹配，重叠序列可以完全由仅属于一个片段的核苷酸组成，也可以按任意组合在两个相邻片段之间进行分配。在两条 DNA 链上标记重叠序列的 5' 第一个核苷酸和 3' 最后一个核苷酸 (框内序列)。最后，从第一个 5' 核苷酸开始，沿 5' 到 3' 方向复制整个重叠序列，并在必要时继续向 3' 端添加核苷酸，直至达到基因特异性引物序列所需的长度 (步骤 IV)。

反向重叠引物的设计遵循上述相同步骤，但需从互补 DNA 链上沿 5' 到 3' 方向复制序列。请注意，共享同一重叠序列的两条引物始终分别用于不同的 PCR 反应，每条均需与在其各自 DNA 片段另一端引发互补序列的引物搭配使用 (步骤 V)。

图 2. 含同源臂引物设计：载体和插入片段源于 PCR 扩增

I. Create a final sequence file displaying both DNA strands:

```
Vector Left Arm      Insert      Vector Right Arm
-----
GTTTAACTTTAAGAAGGAGATACAT ATGACCATGATTACGGATTCACT... AGTTGGTCTGGTGCAAAAATAA TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAA
CAAATTGAAATTCCTCTATATGTA TACTGGTACTAATGCCTAAGTGA... TCAACCAGACCAGAGTTTTTATT ACTCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTTT
```

II. Mark the junctions between the vector and the insert:

```
GTTTAACTTTAAGAAGGAGATACAT | ATGACCATGATTACGGATTCACT... AGTTGGTCTGGTGCAAAAATAA | TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAA
CAAATTGAAATTCCTCTATATGTA | TACTGGTACTAATGCCTAAGTGA... TCAACCAGACCAGAGTTTTTATT | ACTCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTTT
```

III. Choose 15-25 nt overlap region between vector and insert:

```
GTTTAACTTTAAGAAGGAGATACAT | ATGACCATGATTACGGATTCACT... AGTTGGTCTGGTGCAAAAATAA | TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAA
CAAATTGAAATTCCTCTATATGTA | TACTGGTACTAATGCCTAAGTGA... TCAACCAGACCAGAGTTTTTATT | ACTCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTTT
```

IV. Design overlapping primers starting from the first 5' nucleotide of the overlap region:

```
GTTTAACTTTAAGAAGGAGATACAT | ATGACCATGATTACGGATTCACT... AGTTGGTCTGGTGCAAAAATAA | TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAA
CAAATTGAAATTCCTCTATATGTA | TACTGGTACTAATGCCTAAGTGA... TCAACCAGACCAGAGTTTTTATT | ACTCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTTT
```

Primer FP1 (red) and Primer RP2 (red) are on the top strand, pointing right. Primer FP2 (blue) and Primer RP1 (blue) are on the bottom strand, pointing left.

V. Amplify Insert with primers FP1 + RP1 and Vector with primers FP2 + RP2:

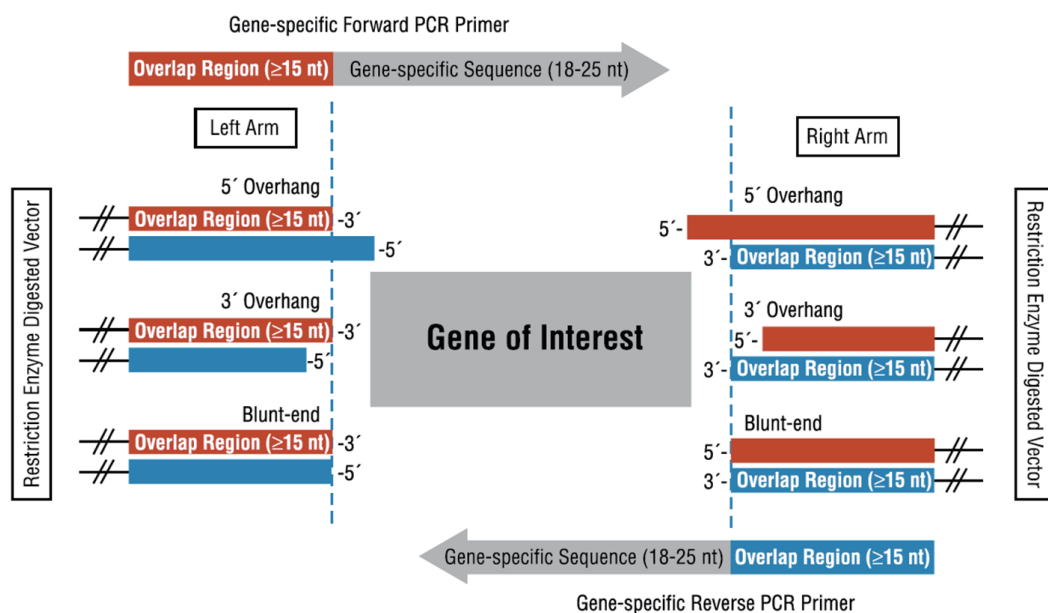
```
Vector Left Arm      Overlap      Vector Right Arm
-----
GTTTAACTTTAAGAAGGAGATACAT | ATGACCATGATTACGGATTCACT... AGTTGGTCTGGTGCAAAAATAA | TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAA
CAAATTGAAATTCCTCTATATGTA | TACTGGTACTAATGCCTAAGTGA... TCAACCAGACCAGAGTTTTTATT | ACTCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTTT
```

Inset showing the overlap region with primers FP1, RP1, FP2, and RP2.

经限制性内切酶处理的载体末端可能产生 5'-突出端、3'-突出端或平末端。当载体经酶切线性化后，用于同源重组的全部重叠序列必须来源于载体序列，并需添加至用于扩增插入片段的引物中（图 3）。

靶基因的正向引物，其重叠区应与载体左臂突出端的 3' 末端对齐，并反向延伸直至 Tm 值 $\geq 48^{\circ}\text{C}$ （橙色标记）；此引物在 3'-末端还包含一段靶基因特异性序列（灰色标记）。需注意，原用于消化载体的限制性酶切位点在组装后的产物中将不复存在。但可在重叠区与基因特异性序列区之间添加额外核苷酸，以恢复原有酶切位点或引入新的独特酶切位点。靶基因反向引物的设计遵循相似原则。

图 3. 含同源臂引物设计：载体源于限制性内切酶切割，插入片段源于 PCR 扩增



组装操作说明

最佳用量

在组装 2 或 3 个片段时，NEB 建议 DNA 片段总量为 0.02–0.5 pmols；随着片段数量或长度的增加，组装效率会降低。为了根据片段长度和质量计算每个片段的 pmols 数量以实现最佳组装，我们推荐使用 NEB 免费在线设计工具：NEBuilder[®] Protocol Calculator (<https://nebuildercalculator.neb.com/>)

或以下公式：

$$\text{pmols} = (\text{weight in ng}) \times 1,000 / (\text{base pairs} \times 650 \text{ daltons})$$

50 ng 的 5000 bp dsDNA 约为 0.015 pmols

50 ng 的 500 bp dsDNA 约为 0.15 pmols

每个片段的质量可以通过以下方法测得：使用 NanoDrop[®] 仪器，通过 260 nm 波长处的吸光度，或通过琼脂糖凝胶电泳后溴化乙锭染色进行估算。

操作步骤

使用前冰上融化并混匀预混液。

1. 在冰上配置以下反应体系：

	组装反应配置
	2-3 片段组装 *
推荐的 DNA 摩尔比	载体 : 插入片段 = 1:2 或 1:3
PCR 片段 + 线性化载体	X μ l (0.02–0.5 pmol) **
快易无缝克隆预混液 (2X)	10 μ l
去离子水	10–X μ l
总体积	20 μ l

* 本操作说明适合 2-3 片段组装优化，如需组装更多片段，请进行优化。

** 如需优化克隆效率可使用约 50–100 ng 的载体和至少 2 倍过量的插入片段。若插入片段小于 200 bp，可以用 5 倍或更多量的插入片段提高克隆效率。组装反应中未纯化的 PCR 片段总量不应超过 20%。每个片段之间设计 15-25 碱基对的重叠区域可以帮助实现理想的组装效率。

2. 组装 2-3 个片段时，将反应体系放在热循环仪上以 50°C 温育 15 分钟。温育后，将样品置于冰上或 -20°C 保存，以便后续的转化反应。

注意事项

* 对于生成 PCR 产物，我们推荐使用 Q5[®] 超保真 DNA 聚合酶 (NEB #M0491) 或相关产品，如：Q5 热启动超保真 DNA 聚合酶 (NEB #M0493) 或 Q5 热启动超保真 2X 预混液 (NEB #M0494)。

* 在某些情况下，延长温育时间至 60 分钟可能有助于提高组装效率。

* 如果您正在处理大于 10 kb 的大型质粒，我们推荐使用 NEB[®] 10- beta *E. coli* 感受态细胞 (高效级) (NEB #C3019H)。如果您的质粒或插入片段包含重复序列，我们推荐使用 NEB[®] Stable *E. coli* 感受态细胞 (高效级) (NEB #C3040H)。

* 进行化学感受态细胞转化时，如果使用 NEB 的感受态细胞，在感受态细胞中加入冷藏的组装反应液 2 μ l，可直接进行转化。如果感受态细胞购买自其他制造商，在转化前务必用 H₂O 将组装产物稀释 4 倍后，再将 2 μ l 稀释后的组装产物加入感受态细胞中。转化操作说明详见第 5 页。

* 对于转化成功的感受态细胞的筛选，我们推荐使用含有适当抗生素的 LB 平板。

化学感受态细胞转化操作说明

1. 在冰上解冻化学感受态细胞。
2. 将 50 μl 的感受态细胞转移到 1.5 ml 的微量离心管中 (如果需要)。
3. 如果使用 NEB 的感受态细胞, 在感受态细胞中加入冷藏的组装反应液 2 μl , 并直接进行步骤 4。如果感受态细胞购买自其他制造商, 在转化前用 H_2O 将组装产物稀释 4 倍。可以通过将 5 μl 的组装产物与 15 μl 的 H_2O 混合来实现。将 2 μl 稀释后的组装产物加入感受态细胞中。
4. 轻轻上下吹打或轻弹离心管 4-5 次以混合, 不要涡旋。将混合物置于冰上 30 分钟, 不要晃动混合。
5. 在 42°C 下热激 30 秒*, 不要晃动混匀。
6. 将混合物置于冰上 2 分钟。
7. 向离心管中加入 950 μl 室温 SOC 培养基*。
8. 37°C 恒温震荡 (250 rpm) 培养 60 分钟。
9. 将培养基平板在 37°C 预热。
10. 将 100 μl 的细胞悬液均匀涂布在含有相应抗生素的平板上; 或将菌液 5,000 rpm 离心 5 min, 弃掉 900 μl 上清。用剩余培养基重悬菌体后涂板。
11. 在 37°C 下过夜培养。

* 请注意: 请遵循制造商关于热激步骤的持续时间、温度以及最佳复苏培养基的说明

NEB 推荐使用 NEB[®] 5-alpha *E. coli* 感受态细胞 (高效级) (NEB #C2987) 来转化组装产物。也可以使用除 BL21、BL21(DE3)、Lemo21(DE3) 和 Nico21(DE3) 之外的其他 NEB *E. coli* 感受态细胞。例如, 对于难以表达的蛋白质, 可以使用 Shuffle T7 Express 感受态大肠杆菌进行表达。当使用非 NEB 供应的 *E. coli* 感受态细胞时, 我们观察到快易无缝克隆预混液组装反应的转化效果有所降低。

电转感受态细胞转化操作说明

1. 在冰上解冻电转感受态细胞。
2. 将 50 μl 的电转感受态细胞转移到预冷的、间隙为 1 mm 的电击杯中。
3. 在电转前, 用 H_2O 将组装产物稀释 3 倍。这可通过将 5 μl 的组装产物与 10 μl 的 H_2O 混合来完成。将 1 μl 稀释后的组装产物加入电转感受态细胞中。
4. 轻轻上下吹打混匀。
5. 一旦 DNA 加入细胞, 可以立即进行电穿孔。不需要将 DNA 与细胞孵育。
6. 电穿孔后立即向电击杯中加入 950 μl 室温 SOC 培养基。
7. 37°C 恒温震荡 (250 rpm) 培养 60 分钟或者旋转培养。
8. 将培养基平板在 37°C 预热。
9. 将 100 μl 的细胞悬液均匀涂布在板上。

10. 在 37°C 下过夜培养。

常见问题解答

问 1. 这种方法与传统克隆方法相比有哪些优势？

答 1: 快易无缝克隆采用 Gibson 组装技术，该方法可以在线性化载体的几乎任何位置插入一个或多个 DNA 片段，并且不依赖于特定序列中限制性位点的存在来进行合成或克隆。因此，用户可以完全控制组装的内容，并且可以避免由于多片段组装而引入无关序列。此外，相较于使用限制性内切酶的传统克隆方法，基于 Gibson 组装的快易无缝克隆速度更快。不仅如此，相较于传统克隆方法，快易无缝克隆可以在单次反应中更高效的连接多个 DNA 片段。

问 2. 一个反应中可以组装多少个 DNA 片段？

答 2: 一个反应中可以组装的 DNA 片段数量取决于片段的长度和序列。基于 Gibson 组装方法可以将多个片段高效地一同组装到载体中。然而，当使用快易无缝克隆预混液时，我们建议在一个反应中将三个或更少的插入片段组装到载体中。

问 3. 使用这种组装方法可以采用的重叠序列最短长度是多少？

答 3: 已经证明，对于只有 12 bp 重叠末端的 DNA 片段也可以进行有效的组装。然而，这取决于重叠区域的 GC 含量。我们建议在对双链 DNA 进行组装时使用 15 bp 或更长的重叠序列且 $T_m \geq 48^\circ\text{C}$ (A-T pair = 2°C , G-C pair = 4°C)。

问 4. 使用这种组装方法可以采用的重叠序列最长长度是多少？

答 4: 快易无缝克隆预混液中的外切酶含量已经进行了优化，因此可以组装那些包含不超过 100 bp 重叠区域的 DNA 分子。

问 5. 这种方法可以组装 ≤ 200 bp 的双链 DNA 片段吗？

答 5: 可以。为了获得最佳结果，每个较小片段的摩尔数应至少是载体的 5 倍 (插入片段 : 载体 $\geq 5:1$)，并将反应中 DNA 的总量保持在 0.02 - 0.5 pmol。

问 6. 快易无缝克隆预混液可以组装单链 DNA 寡核苷酸和双链 DNA 片段吗？

答 6: 可以。然而，需要先确定每条寡核苷酸的最佳工作浓度。作为试验的起点，我们建议每条寡核苷酸的起始浓度为 45 nmol。这接近或等于 12 条长 60 个碱基的寡核苷酸，其中每条寡核苷酸都包含 30 个碱基的重叠区域。

问 7. 可以使用更长或更短的温育时间吗？

答 7: 组装 2-3 个片段时，建议温育时间为 15 分钟。通常不建议反应时间少于 15 分钟。延长温育时间 (最长可达 4 小时) 可能会提高多个片段的组装效率。不要将反应过夜。

问 8. 可以在其他温度下进行反应吗?

答 8: 经过优化, 反应的最佳温度为 50°C, 但实验证明在 40°C 至 50°C 之间反应也可进行。

问 9. 载体消化后是否需要使限制性内切酶失活?

答 9: 通常不需要使限制性内切酶失活, 但在某些情况下, 失活可能会提高转化效率。如果插入片段也携带用于载体线性化的限制性位点, 则在将线性化载体与插入片段混合进行组装反应之前, 有必要通过加热使限制性内切酶失活。如果使用耐热限制酶来线性化载体, 那么在与插入片段接触之前, 应通过 DNA 纯化柱、苯酚 - 氯仿抽提或琼脂糖凝胶电泳等方法对载体进行纯化。

问 10. 如果想通过 PCR 制备重叠的双链 DNA 片段, 需要使用 PAGE 或 HPLC 纯化的 PCR 引物吗?

答 10: 不需要。可以使用标准的脱盐纯化的引物。

问 11. 如果想将单链 DNA 寡核苷酸组装入双链 DNA 片段中, 需要使用通过 PAGE 或 HPLC 纯化的寡核苷酸吗?

答 11: 不需要。可以使用标准的脱盐纯化的引物。

问 12. 可以使用完全由 His 标签重复序列 (即 CACCACCACCACCAC) 组成的 15 个核苷酸的重叠序列吗?

答 12: 不可以, 请确保在 His 标签序列的两侧各添加至少 2 个不属于 His 标签序列的核苷酸。请避免在重叠序列的末端出现重复序列。

问 13. 可以 PCR 扩增组装的产物吗?

答 13: 可以。组装好的 DNA 分子是共价连接的, 可以进行 PCR 扩增。此外, 如果最终产物是闭合的环状 DNA 分子, 它可以用作滚环扩增 (RCA) 的模板。

问 14. 如果我的组装反应在转化到 *E. coli* 后没有产生菌落、菌落数量少或克隆的插入片段大小不正确, 我该怎么办?

答 14: 有以下操作建议:

- 在琼脂糖凝胶上分析反应产物。一个有效的组装反应将显示出正确大小的组装产物以及消失的片段。
- 检查重叠 DNA 片段的引物设计, 确保有足够的重叠序列以促进组装。
- 考虑克隆的插入片段可能对 *E. coli* 有毒性, 可能需要使用低拷贝载体, 如 BAC。由于组装产物是一个共价闭合分子, 也可以通过 PCR 或 RCA 进行扩增。
- 我们的测试表明, 感受态细胞的选择至关重要。我们推荐使用高效化学感受态细胞, 如 NEB® 5-alpha *E. coli* 感受态细胞 (高效级)(NEB #C2987)。反应产物可以直接加入细胞中, 无需稀释,

尽管进一步稀释反应混合物可能会提高转化效率。然而，当使用其他供应商的高效化学感受态细胞时，如果没有得到任何菌落，我们建议在转化前将反应混合物稀释 4 倍。如果使用包括 NEB 在内的高效电转感受态细胞进行转化试验，我们建议将反应混合物稀释 3 倍。

问 15. 如何减少空载体背景菌落的数量？

答 15: 为了显著减少不需要的空载体背景菌落，载体应该是 PCR 产物而不是限制性酶切片段。如果背景问题仍然存在，可以用 DpnI 处理 PCR 扩增的载体以去除模板残留，如果适用，可以在电泳后从琼脂糖凝胶中提取。

问 16. 使用快易无缝克隆预混液组装的 DNA 构建体适合用哪种类型的感受态细胞进行转化？

答 16: 使用快易无缝克隆预混液组装得到的 DNA 构建体与大多数大肠杆菌感受态细胞兼容。NEB 推荐使用 NEB® 5-alpha *E. coli* 感受态细胞 (高效级, NEB #C2987)。如果组装产物大于 10 kb, NEB 推荐使用 NEB® 10-beta *E. coli* 感受态细胞 (高效级, NEB #C3019) 或 NEB® 10-beta *E. coli* 电转感受态细胞 (NEB #C3020)。

问 17. 我可以用电转代替化学转化吗？

答 17: 可以，但是需要将组装产物稀释 3 倍，并且仅使用 1 µl 进行电穿孔。

订购信息

货号	产品名称	规格 (rxns)
M5522S	快易无缝克隆预混液	10
M5522L	快易无缝克隆预混液	50

This product and content are covered by one or more patents, trademarks and/or copyrights owned or controlled by New England Biolabs, Inc (NEB). The use of trademark symbols does not necessarily indicate that the name is trademarked in the country where it is being read; it indicates where the content was originally developed. See www.neb.com/trademarks. The use of this product may require you to obtain additional third-party intellectual property rights for certain applications. For more information, please email busdev@neb.com.

NANODROP® is a registered trademark of NANODROP TECHNOLOGIES LLC

in
for
CHINA
CHINA

For Research Use Only.

New England Biolabs is an ISO 9001,
ISO 14001 and ISO 13485 certified facility.



NEB 视频学习站



NEB 微信公众号



NEB 技术资料站

NEB 完美品质 成就科学梦想

NEB 中国 100083 北京海淀区王庄路 1 号清华同方科技广场 B 座 6 层
客服热线: 400-811-2220 / 400-690-3366 电话: 010-82378266
客户服务: info@neb-china.com 技术支持: support@neb-china.com
市场活动咨询: cnmarketing@neb.com
网站: www.neb.cn NEB 官方微信: NEBiolabs

