



3. PCR 扩增插入片段

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 Assembly Master mix，置于冰浴中，配制下图反应体系（如不慎将液体粘在管壁，可通过短暂离心沉降）

2X EasyFusion Assembly Master mix	5 ul
线性化克隆载体	10-50 ng
插入片段	20-50 ng
ddH ₂ O	to 10 ul

注意：10 ul 反应体系中，载体和各插入片段建议量在 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 15-30 分钟（对于多片段重组或大片段重组，建议反应时间 30 分钟，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 $> 5 \times 10^7$ cfu/ug。转化步骤按照不同菌种的要求进行或者按标准转化操作进行即可。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，有效期 1 年。

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. 重组质粒大小的增加 (>12kb)，克隆效率会显著降低，选择稳定性更好的感受态及转化效率更高效的感受态细胞。
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。

