

BG GeneMaster Kit (20T)

——请在使用前仔细阅读说明书



目录号: BG0006

保存条件: 2×GM Mix 和 2×Super PCR Mix -20 °C保存 12 个月, BGT1 UltraCompetent Cells -80°C保存 6 个月

产品说明

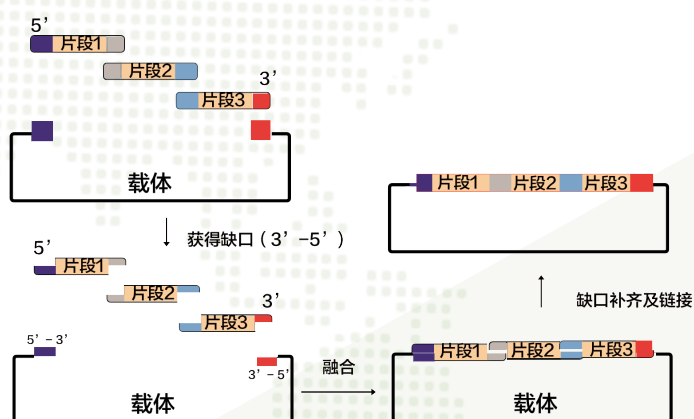
本产品利用高效同源重组原理, 将片段按照同源序列重组在一起; 可用于目的片段一步克隆、多片段重组及多点突变。

试剂盒组成

Component	BG0006
2×GM Mix	2×50 μl (20T)
BGT1 UltraCompetent Cells	10×100 μl (20T)
2×Super PCR Mix	1 ml

多片段无缝拼装

原理图



多片段的制备

引物设计

1. 用于 PCR 扩增的重组引物包含 19 bp 左右的 5' 重组序列 (如果线性化载体为粘性末端, 重组区域从末端的 3' 最后一个碱基往 5' 方向开始计算) 和 20 bp 左右 3' 基因特异序列 (基因特异序列设计与普通基因扩增引物设计一致);
2. 多片段装配时 (以 3 片段重组为例), 按照酶切位点切开上下游各 19bp 作为重组接头 (AdaptorA 和 AdaptorB), 用 AdaptorA+F1/R1 引物扩增带 A/C 接头的片段 1 (C 接头为片段 1 除 A 接头另一端 19 碱基序列); 用 AdaptorC-F2/R2 引物扩增带 C/D 接头的片段 2 (D 接头为片段 2 除 C 接头另一端 19 碱基序列); 用 AdaptorD-F3/AdaptorB-R3 引物扩增带 D/B 接头的片段 3。(强烈建议用高保真酶对目的片段进行扩增, 所得片段如果条带单一且无引物二聚体无需纯化可直接用于下游实验)。

片段组装

Component	Volume (μl)
2×GM Mix	5
酶切载体片段	1 (10-50ng)
PCR 产物 (1.....n)	0.5-1 (10-200ng) ^N
ddH ₂ O	加到 10

按照上述表格将各个组分加入到 PCR 管中，混合均匀后将混合物放置到 PCR 仪器中，50°C 反应 15min 到 60min(建议反应时间:两片段拼装时间为 15min;3 片段拼装时间延长至 20min;4 片段拼装时间延长至 30min;更多片段拼装时请延长至 60min;如果目的片段有复杂二级结构或分子量过少有可能会影响链接效率，如果出现上述情况可以在建议反应时间到达后，取 1 μl 反应产物用于转化，剩余产物继续反应至 60min 并将反应产物放置到-20°C以备用)

大肠杆菌转化

1. 取出 1μl 链接产物与 50 μl BGT1 Ultracompetent Cells 混匀，在冰上放置 4min;
2. 42°C热激 40S;
3. 加入 1ml LB 液体培养基，37°C 200rpm 培养 1h;
4. 3000rpm 离心 1min 后吸出上清，重悬后涂板并于 37°C培养 16h 左右。

菌落 PCR 验证

Component	Volume (μl)
2×Super PCR Mix	25
前引物 (10 μM)	1
后引物 (10 μM)	1
ddH ₂ O	加到 50

分装 PCR 预混液后，将目的单克隆挑入 PCR 管中，按照以下条件进行反应：

94°C, 2min

94°C, 20S

50-60°C, 20S

72°C, 2K/min

72°C, 5min

30 cycles

注：

1. 可以在引物中间设计突变位点，获得定点突变重组构建；
2. 利用载体上的单酶切位点或双酶切位点均能获得高效的重组效率，但是单酶切情况下建议对载体进行回收后再用于重组；

本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床、食品及化妆品等