BG GeneMaster Pro Kit ——请在使用前仔细阅读说明书



目录号: BG0016

保存条件: 2.5×GM buffer 反复冻融易失活, 分装后-20°C保存 12 个月; Em enhancer、2×Super PCR Mix -20°C保存 12 个月; BGT1 UltraCompetent Cells (选配) -80°C保存 6 个月

产品说明

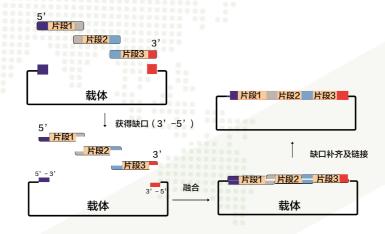
本产品利用高效同源重组原理,将 1-5 个片段按照同源匹配序列识别而重组形成目的片段;可用于目的片段一步克隆、多片段重组及多点突变。

试剂盒组成

Component	BG0016
2.5×GM buffer	2×100 μl
Em enhancer	20 μl
2×Super PCR Mix	1ml
BGT1 UltraCompetent Cells	10×100 μl

多片段无缝拼装

原理图



引物设计

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);建议在设计重组序列的时候不考虑酶切位点为重组区域,以免重组区域过短而造成实验失败。

公司网址:www.bgbiotech.com 联系电话:+86-023-65229032 传真:+86-023-65106884

BG GeneMaster Pro Kit ——请在使用前仔细阅读说明书



片段组装

Component	Volume (µl)
2.5×GM buffer	4
Em enhancer	0.5-1
酶切载体片段	1 (10-50ng)
PCR 产物 (1n)	各 0.5-1 (各大约 10ng-500ng) ^注
ddH_2O	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 (建议反应时间和 Em enhancer 的使用量: 片段二级结构简单,片段 <1000bp,目的片段数目为 1-3 个可以使用 0.5 μl Em enhancer; 如果目的片段有复杂二级结构或片段>1000bp 或者目的片段数目多于 3 个,请使用 1 μl Em-Uni enhancer; 连接时间根据加入酶量和片段难度共同决定,绝大多数情况 30min 反应足够。建议反应 30min 后,取 5 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);注: 片段加入量与片段的长度成正比,如果实验结果不理想可以增加片段加入量而增加实验效率。

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_2O	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

30 cycles

72°C, 2K/min

72°C, 5min

本产品仅供科研使用,请勿用于医药、临床、食品及化妆品等

公司网址:www.bgbiotech.com 联系电话:+86-023-65229032 传真:+86-023-65106884