

目录号: BG0007

保存条件: BGT1 Ultracompetent Cells -70℃保存 6 个月, 其它组分-20℃保存 12 个月

产品说明

该载体通过自杀基因 ccdB 表达自动筛选重组子: 当载体与片段连接成功时, 自杀基因无法正常表达, 包含重组子的细胞可以正常生长; 当载体与片段连接不成功时, 自杀基因表达, 使得细胞无法正常生长; 本试剂盒适用于平末端片段的克隆。

产品特点

1. 高效: 阳性率接近 100%;
2. 省心: 30min 到 24h 任意反应时间;
3. 提供供庆大霉素抗性标记, 便于下游实验;
4. BGT1 Ultracompetent Cells 感受态转化效率高, 生长速度快, 保证克隆数, 节约筛选时间;
5. 用引物 M13-Forward Primer 或 M13-Reverse Primer 进行测序。

产品组成

Component	BG0007
Zero-GM Plasmid(Linearized)	20μl (50ng/μl)
2×T4 DNA ligase Mix	100μl
2×Super PCR Mix	1ml
BGT1 Ultracompetent Cells	10×100μl

PCR 产物的制备

1. 引物二聚体和非特异性扩增会降低阳性率, 如果有引物二聚体或非特异性杂带请胶回收 PCR 产物; 如果没有引物二聚体或非特异性杂带可以直接用于连接 (T4 DNA ligase Mix 通过特殊优化, 加入未纯化的 PCR 产物 4 μl 也可以达到 90%以上的连接效率);
2. 酶的选择: 扩增产物为平末端的高保真 DNA 聚合酶。

克隆反应体系

Component	Volume (μl)
2×T4 DNA ligase Mix	5
PCR 产物	4
Zero-GM Plasmid(Linearized)	1

室温反应 15min-4h, 推荐反应时间如下:

本产品仅供科研使用请勿用于医药、临床、食品及化妆品等

片段长度	片段浓度	反应时间
<500bp	N	15min
500bp-1000bp	<100ng/>100ng/(μ l)	30min/15min
1000bp-3000bp	<100ng/>100ng/(μ l)	2h/1h
3000bp-4000bp	<100ng/>100ng/(μ l)	4h/2h
>4000bp	N	4°C 过夜

转化

1. 加 1 μ l 链接产物于 50 μ l BGT1 Ultracompetent Cells 中，轻柔混匀，冰浴 4min-10min;
2. 42°C 水浴热激 40-50S，立即置于冰上;
3. 加入 500 μ l 无抗生素 LB，200rpm、37°C 预培养 1h;
4. 3000rpm 离心 1min，弃上清后用残液重悬菌体，涂布到含有 50mg/L 庆大霉素的 LB 平板上，37°C 培养过夜。

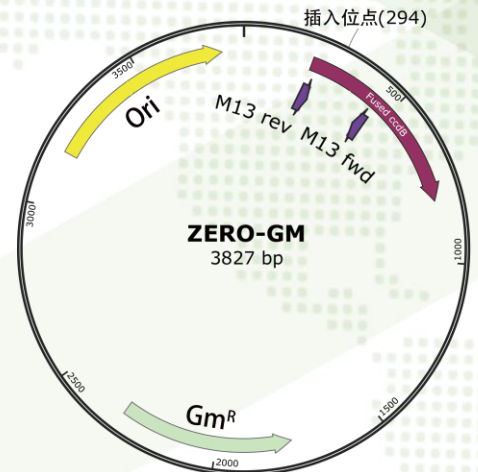
PCR 鉴定

按照下表配置 PCR 反应液

Component	Volume (μ l)
2 \times Super PCR Mix	10
前引物 (10 μ M)	0.5
后引物 (10 μ M)	0.5
ddH ₂ O	9

扩增条件

- | | |
|--------------|-------------|
| 94°C, 2min | } 30 cycles |
| 94°C, 20S | |
| 50-60°C, 20S | |
| 72°C, 2K/min | |
| 72°C, 5min | |



Fused ccdB: 217-810

M13 revers priming site: 205-211

M13 Forward priming sites: 354-370

庆大霉素抗性基因: 1765-2298

Ori: 3172-3176

插入位点: 294-295

M13 Rev

CAGGAAACAGCTATGACCAATGATTACGCCAAGCTCAGAATTAACCCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCA
GGTTTAAACGAATTGGCCCCC 目的片段 GGGGGCCAATTCGCGGCCGCTAAATTCAATTCGCCCT
ATAGTGAGTCGTATTACAATTC 目的片段 ACTGGCCGTCGTTTTAC

M13FWR