

目录号: BG0017

保存条件: 2.5×GM-Uni buffer 反复冻融易失活, 分装后-20℃保存 12 个月; Em-Uni enhancer -20℃保存 12 个月

#### 产品说明

本产品利用高效同源重组原理, 将单个片段按照同源序列重组在一起; 可用于目的片段一步克隆。

#### 试剂盒组成

Component	BG0017
2.5×GM-Uni buffer	2×100 μl
Em-Uni enhancer	20 μl

#### 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。

#### 片段组装

Component	Volume (μl)
2.5×GM-Uni buffer	4
Em-Uni enhancer	0.5-1
酶切载体片段	1 (10-50ng)
PCR 产物	0.5-1 (大约 100ng)
ddH <sub>2</sub> 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℃反应 15min 到 60min (建议反应时间和 Em-Uni enhancer 的使用量: 片段二级结构简单, 片段 <1000bp, 可以使用 0.5 μl Em-Uni enhancer; 如果目的片段有复杂二级结构或片段 >1000bp, 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℃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℃热激 40S;
3. 加入 1ml LB 液体培养基, 37℃ 200rpm 培养 1h;
4. 3000rpm 离心 1min 后吸出上清, 重悬后涂板并于 37℃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 <sub>2</sub> 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

本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床、食品及化妆品等