

2×GenRec 单段重组试剂盒

贮存

-20°C，避免反复冻融

概述：2×GenRec 单段重组试剂盒是一款简单、快速、高效的单片段 DNA 定向克隆产品，本试剂盒可以将 PCR 产物定向克隆至任意载体的任意位点。将载体在克隆位点进行线性化，并在插入片段 PCR 引物 5' 端引入线性化克隆载体末端序列，使得插入片段 PCR 产物 5' 和 3' 最末端分别带有和线性化克隆载体两末端对应的完全一致的序列(20 bp ~ 40 bp)。将这种两端带有载体末端序列的 PCR 产物和线性化克隆载体按一定比例混合，在重组酶的催化下，仅需反应 15-30 min 即可进行转化，完成定向克隆。克隆阳性率可达 90%以上。试剂盒中预混了重组酶和重组反应所需缓冲液，并添加了特殊成分，可显著提高重组克隆效率。

产品组成：

2×GenRec Master Mix

产品特点：

- 简单高效的定向无缝克隆
- 灵活的序列设计，无需考虑酶切位点
- 无需 PCR 纯化步骤

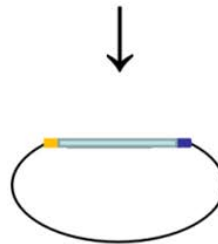
1、制备线性化载体（酶切或PCR）



+



2、扩增带同源臂的目的片段



3、载体、片段和2×GenRec Master Mix轻轻混匀，50°C反应15-30min

4、转化涂平板

使用说明

1、反应体系

冰上配制如下反应体系。

2×GenRec Master Mix	10 μL
线性化克隆载体	A ng
插入片段 (PCR 扩增产物)	B ng
ddH ₂ O	Up to 20μL

注：如果不慎将液体粘在管壁，可通过短暂离心使其沉入管底。

GenRec Master Mix 重组反应体系最适 DNA 使用量为线性化片段 0.03pmol。该摩尔数对应的 DNA 质量可由以下公式计算获得：

$$\text{片段添加量 (ng)} = 0.02 \times \text{片段碱基对数 (bp)} (\text{对应的片段浓度为 } 0.03 \text{ pmol})$$

2、重组反应

- (1) 在冰上解冻 2×GenRec Master Mix，颠倒混匀。
- (2) 在无菌管中加入载体和片段（按上述要求），用无菌水补足到 10μL，最后加入 10 μL 2×GenRec Master Mix，用移液器轻轻吸打混匀避免气泡产生。
- (3) 50°C 恒温反应 15-30min，在冰上放置 3-5min。

3、转化

- (1) 取化学转化感受态细胞于冰上解冻。
- (2) 取上述反应液 10 μL 加入到感受态细胞中充分混匀。冰浴 10min。
- (3) 将离心管置于 42°C 水浴锅中热激 90s，然后迅速放回冰上，使细胞冷却 2~3min。
- (4) 向离心管中加入已预热的无菌 LB(或 SOC)培养液 600μL，37°C 恒温振荡培养 45~60min。
- (5) 短暂离心弃上清，吸取 100 μL 的新鲜 LB 培养基重新悬浮，将菌液均匀涂布在含有适当抗生素的平板上。将平板倒置，于 37°C 过夜培养。

4、克隆鉴定

菌落 PCR。用无菌的枪头或牙签将单个菌落挑至 20~50μL LB 培养基中混匀 直接取 1μL 作为 PCR 模板 使用 2×Taq DNA Polymerase Master 进行菌落 PCR 实验。

注意事项

- 为达到最优的重组效果，请保证体系中 PCR 片段和载体的质量，建议 DNA 样品 A_{260/280}>1.8，浓度>40ng/ul。
- 当得到的 PCR 产物条带单一时，可无需纯化，产物可直接用于重组。
- EDTA 等金属离子螯合剂对该产品有抑制作用，必须保证反应体系中不含该类螯合剂。