



DNA Assembly Cloning Kit

目录

| | |
|--------------------|---|
| 1. 产品介绍..... | 1 |
| 2. 操作步骤..... | 1 |
| 3. DNA片段加入量计算..... | 2 |
| 4. 订购信息..... | 2 |

产品介绍

DNA Assembly Cloning Kit 是一种简单、快速并且高效的 DNA 无缝克隆试剂盒,可将插入片段定向克隆至任意载体的任意位点。使用任意方式将载体进行线性化,在插入片段正 / 反向 PCR 引物 5'端引入线性化载体的末端序列,使得 PCR 产物 5'和 3'最末端分别带有和线性化载体两末端一致的序列 (25-40 bp)。这种两端带有载体末端序列的 PCR 产物和线性化载体按一定比例混合后,在重组酶的催化下,50°C反应 15 min 即可进行转化,完成定向克隆。

产品组分:

| 组分 | 50 rxn |
|---------------------------------|--------|
| 2× enzymes mixture | 500 μL |
| Positive control(线性化载体和2个DNA片段) | 20 μL |

保存: -20 °C可以长时间存放,避免反复冻融

适用范围:

- ▶ 快速克隆
- ▶ 高通量克隆
- ▶ 无缝克隆
- ▶ 定点突变

自备材料:

DNA 片段;
线性化载体;
感受态细胞: 克隆菌株制备的化学感受态细胞;
DH5α Competent E.coli Strain 常规克隆,适用于 <15 kb 质粒;
XL10 Competent E.coli Strain 大片段克隆,适用于 >10 kb 质粒;
其他材料: ddH₂O、PCR 管、PCR 仪等。

操作步骤

1. 在冰上配置以下反应体系:

| | 克隆反应 | 阳性对照 |
|--------------------|---------|-------|
| 每个DNA 片段 | X μL | 10 μL |
| 线性化载体 | Y μL | |
| 2× enzymes mixture | 10 μL | 10 μL |
| 去离子水 | 至 20 μL | |

注: * 阳性对照含载体和 2 个 DNA 片段。

* 每个克隆反应体系中,线性化载体和单个 DNA 片段推荐使用量各为 0.1 pmol。

* 若您使用未纯化的 PCR 产物进行重组反应,未纯化的 DNA 片段的体积不能超过总反应体积的 10%。



2. 用移液枪轻柔地混匀反应物。
3. 将反应管置于 PCR 仪中 50°C 孵育 15 min(>6 个片段的拼接, 时间延长为 30 min)。
4. 吸取 2 μL 的反应液转化大肠杆菌感受态细胞。推荐使用高效感受态细胞, 即每 1 μg pUC19 载体转化后至少能得到 >2×10⁸ 转化子。
5. 若需要进行电转, 将反应液稀释 5 倍, 再吸取 1 μL 进行转化感受态细胞。
6. 取 1/10 体积的转化细胞进行涂布, 若您克隆多于 3 个目的片段, 建议您对转化后的感受态离心后再涂布。对于阳性对照反应, 取 1/10 体积的转化细胞涂布在含 0.1 mM IPTG 的氨苄培养板上。
7. 37°C 过夜培养。

DNA 片段加入量计算

1. 每个反应中单个 DNA 片段的推荐使用量为 0.1 pmol。
2. 推荐 DNA 片段和载体的摩尔比为 1:1。
3. 当克隆片段小于 200 bp 时, 推荐 DNA 片段和载体的摩尔比为 5:1。
4. 使用 UV 或荧光检测目的 DNA 片段的浓度, 参考下列公式计算反应中每个 DNA 片段的用量。

$$\mu\text{lof DNA fragment} = \frac{0.65 \times \text{pmol} \times \text{bp}}{\text{ng}/\mu\text{l}}$$

或者您还可以参考下面的表格, 根据片段的长度来粗略估计相应的每个反应中 DNA 片段的用量 (例如: 每个反应中加入 0.1 pmol 的 DNA 片段):

| DNA 片段大小 | 每个反应DNA加入量 |
|----------|------------|
| 0.5 kb | 33 ng |
| 1 kb | 67 ng |
| 1.5 kb | 100 ng |
| 2 kb | 133 ng |
| 3 kb | 200 ng |
| 5 kb | 330 ng |

订购信息

| 产品 | 货号 | 规格 |
|--------------------------|-----------|--------|
| DNA Assembly Cloning Kit | BK0024-01 | 50 rxn |