

Ultra Pro Ligation-Free Clone Mix

Cat.No.EU086

储藏条件: -20℃

产品介绍

Ultra Pro Ligation-Free Clone Mix 是基于同源重组原理开发的一步法单片段/多片段通用型无缝克隆试剂盒, 适用于 1-15 个片段的高效拼接。线性化载体制备方式灵活, 可快速将插入片段定向重组至任何载体的任何位点, 不受酶切位点限制 (特殊情况, 如有毒基因的克隆或插入外源 DNA 后导致质粒本身不稳定等除外)。载体末端与插入片段末端以及相邻插入片段末端之间需要 15~25 bp 能够相互同源重组的完全一致的序列。载体与单个或多个插入片段按适当比例混合后, 仅需 50℃ 反应 5~30 min 即可完成重组, 重组产物直接转化至感受态细胞, 完成定向克隆。

试剂名称	规格	产品货号
Ultra Pro Ligation-Free Clone Mix	100μl (20rxns)	EU086

注: -20℃ 保存, 避免反复冻融, 如每次用量少建议分装成小规格保存使用。

简化操作流程 (此为简化版, 完整手册包含引物设计、实验设置、关键步骤和故障排除等详细信息)

开始前请确认: 载体已通过限制性酶切或 PCR 完全线性化, 插入片段已通过 PCR 扩增并带有用于组装的相应重叠序列, 在冰上配制以下反应体系

组分	体积
Ultra Pro Ligation-Free Clone Mix	5 μL
线性化载体	20 ng/kb
外源 DNA 插入片段	40 ng/kb 或 20 ng/kb
Nuclease-free water	Up to 10 μL

重组反应体系在冰上配制, 总体积 10 μL, 包含 5 μL 的 2× CloneMix、线性化载体和外源片段, 其余用 Nuclease-free water 补足。用量计算时, 单片段重组推荐载体与插入片段摩尔比为 1:2, 推荐克隆载体使用量 = $[0.02 \times \text{克隆载体碱基对数}] \text{ ng}$ (0.03 pmol), 推荐插入片段使用量 = $[0.04 \times \text{插入片段碱基对数}] \text{ ng}$ (0.06 pmol); 多片段重组则推荐各组分子摩尔比 1:1, 推荐克隆载体使用量 = $[0.02 \times \text{克隆载体碱基对数}] \text{ ng}$ (0.03 pmol) 每个插入片段使用量 = $[0.02 \times \text{每个片段碱基对数}] \text{ ng}$ (0.03 pmol)。若计算结果超出 10~100 ng 范围, 则直接取 10 ng 或 100 ng; 若插入片段长度大于载体, 则互换二者的计算方式。配制完成后, 将反应管置于 50℃ 孵育 5~30 分钟 (推荐 15 分钟), 结束后立即冰浴 1~2 分钟终止反应, 产物可直接用于转化或暂存于 -20℃。

转化时, 先将感受态细胞 (如 DH5α) 于冰上解冻, 取 10 μL 重组产物加入 100 μL 感受态中轻柔混匀, 冰上静置 30 分钟, 随后 42℃ 水浴热激 90 秒, 立即转移至冰上冷却 1~2 分钟。向管中加入 900 μL 无抗生素的 SOC 或 LB 液体培养基, 于 37℃、220 rpm 振荡复苏 45 分钟。取 50~200 μL 复苏后的菌液涂布于含相应抗生素的平板上, 也可先离心浓缩后再涂布, 平板倒置于 37℃ 培养箱中培养 12~24 小时 (若重组产物长度 ≥ 15 kb, 培养时间可延长至 24~36 小时)。

后续通过菌落 PCR、质粒 PCR、酶切或测序等方法鉴定阳性克隆。

