

DNA快速连接试剂盒

组分	#M0231	#M0232
快速T4 DNA连接酶	30 μ l	30 μ l \times 5
2 \times 快速连接反应缓冲液	1.0 ml	1.0 ml \times 5

概述: DNA快速连接试剂盒显著缩短了DNA连接反应的时间。在室温 (25°C) 条件下, 使用DNA快速连接试剂盒, 5分钟即可完成DNA片段粘性末端或平滑末端的连接反应。

应用:

1. 载体构建。
2. 文库构建。
3. TA克隆。
4. Linker的连接。
5. 线形DNA的再环化。

快速T4 DNA连接酶贮存溶液: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH7.4 @ 25°C), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50%甘油 (V/V)。

2 \times 快速连接反应缓冲液: 132 mM Tris-HCl (pH7.6 @ 25°C), 20 mM MgCl₂, 15% Polyethylene glycol (PEG 6000), 2 mM ATP, 2 mM DTT。

储存温度: -20°C。

质量控制检测:

本产品已按下述步骤检测转化效率:

pET28a载体经EcoRV消化 (平滑末端) 或HindIII消化 (粘性末端) 后, CIP处理, 回收纯化。

pBR322 DNA经HaeIII消化产生的平滑末端插入片段和 λ DNA经HindIII消化产生的粘性末端插入片段, 采用快速连接步骤, 分别以3:1 (插入片段:载体) 的比例与同样酶切的pET28a载体相连接。连接产物的转化方法 (详见下文)。

每批产品检验均达到下面的标准:

	转化效率 (转化子/ μ g)	
	载体再环化	插入片段的连接
粘性末端	$>5\times 10^6$	$>1\times 10^6$
平滑末端	$>2\times 10^6$	$>1\times 10^6$
未切割载体	2×10^7	

快速连接步骤:

1. 混合50 ng载体和3倍摩尔量的插入片段, 用蒸馏水调整总体积为10 μ l。
2. 加入10 μ l 2 \times 快速连接酶反应缓冲液, 混匀。
3. 加入1 μ l快速T4 DNA连接酶, 彻底混匀。
4. 室温 (25°C) 作用5分钟。
5. 冰上冷却, 然后转化或贮存于-20°C。
6. 不要热失活, 热失活会急速降低转化效率。

转化步骤:

快速连接产物可通过几种不同的方法进行转化, 推荐转化方法如下:

1. 冰上融化感受态细胞。
2. 在1.5 ml微量离心管中, 冷却约5 ng (2 μ l) 的连接混合物。
3. 在DNA样品中加入50 μ l感受态细胞, 通过反复吹吸温和混匀样品。
4. 冰上放置30分钟。

DNA快速连接试剂盒

5. 42°C热休克30秒*，冰上冷却2分钟。
6. 加入950 μl室温培养基*，37°C温育1小时。
7. 取100 μl样品铺在适宜的固体培养基上。
8. 37°C培养过夜。

[*]: 热休克的时间和温度以及复苏的过程请遵循感受态细胞说明书。

注意事项:

1. 使用前彻底混匀，避免反复冻融。

2. 以下为反应中最为关键的一些参数，对它们的调控能够保证连接和转化的成功。

2.1 细胞: 感受态细胞的感受性可以有几个数量级的变化，而连接效率与用来做转化的细胞的感受性直接相关，因此每次试验都一定要转化一个未切割载体作为对照。

2.2 电转化: 电转化可以使转化效率提高几个数量级。在用快速连接反应产物做电转化以前，一定要降低PEG浓度。我们推荐使用柱离心式DNA纯化方法。

2.3 DNA: 用于连接的纯化DNA可以溶解在双蒸水(最好是Milli-Q超纯水)、TE或其他稀释缓冲液中。要获得最适连接，在加2×Rapid Ligation Buffer前，调整载体DNA和插入片段的体积到10 μl。DNA片段体积大于10 μl的，则相应增加2×Rapid Ligation Buffer的体积使之占总反应体积的50%，同样加大DNA连接酶的量。

为保证有效连接，总的载体DNA+插入片段的浓度应当在1-10 μg/ml之间。对单插入来说，插入片段:载体比例在2-6之间最好，低于2:1就会导致低的连接效率，高于6:1则会导致产生多个插入。如果DNA片段的浓度不能确定，就以不同的比例做几个连接反应。

2.4 时间: 用快速连接试剂盒做的大多数连接反应能在25°C，5分钟达到反应终点，长于这个时间效果并不会更好。事实上，连接两小时后转化效率便会降低，如果25°C反应过夜，则转化效率能下降到75%之多。

2.5 DNA的生物学性质: 有些大肠杆菌可能会排斥某些DNA结构(如:反向重复或并列重复);有些重组蛋白可能会对大肠杆菌有毒性，也不能很好的被大肠杆菌所耐受，从而导致较低转化效率或较小的克隆菌斑。

末端摩尔浓度的计算:

摩尔浓度(μM/μl)=[(μg/μl)÷(碱基对×650道尔顿)]×2个末端

举例:

计算一个浓度为250 ng/μl的5 kb线性化载体的末端摩尔浓度: [(0.25 μg/μl)÷(5000×650道尔顿)]×2=1.54 ×10⁻⁷ μM/μl=154 nM/l