

克
必
隆
系
列

CAT#:70602-30

CAT#:70602-100

低温运输，-20℃保存。

TIANDZ

DNA 快速连接试剂盒

Rapid DNA Ligation Kit

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点

DNA 连接反应通过 T4 连接酶催化双链 DNA 的 3'-OH 和 5'-P 形成磷酸二脂键而将 DNA 共价连接在一起。被连接的 DNA 末端可以是粘末端(例如限制性切割 EcoRI 产生的末端), 也可以是平末端(限制性切割 Sma I 产生的末端)。Pheiffer 等人发现 PEG 可以促进 T4 DNA 连接酶催化的连接反应[NAR, 11, 7853-7871, 1983], 连接反应只需十分钟即可完成。

本产品就是根据这一原理设计, 其特点如下:

1. 超快, 整个连接反应只需要室温 5 分钟左右, 反应液可以直接用于转化实验。
2. 高效, 溶液配方经过优化, 每 ug 插入 DNA 连接转化得到的重组子可达 10^7 左右。
3. 既可用于平末端连接, 也可用于粘末端连接, 包括 PCR 产物与 T 载体的连接。
4. 简单, 客户只需要提供载体和插入片段即可。

规格及成分

| 成份 | 编号 | 30 次塑料袋包装 | 100 次塑料袋包装 |
|------|---------|-----------|------------|
| 溶液 A | 70602A | 150 uL | 500 uL |
| 溶液 B | 70602B | 30 uL | 100 uL |
| 使用手册 | 70602sc | 1 份 | 1 份 |

运输及保存

低温运输, -20°C 保存, 有效期一年。

使用方法

一: 连接反应

1. 在无菌的离心管中严格按下表顺序加入列各成分(以 10 uL 体系为例):

| 成分 | 阴性对照管 | 样品管 |
|----------|----------|---------------|
| 溶液 A | 5 uL | 5 uL |
| 插入片段(自备) | - | 0.2-0.5 ug(注) |
| 载体(自备) | 50 ng | 50 ng |
| 无菌水 | 补水到 9 uL | 补水到 9 uL |

注: 插入 DNA 片段的摩尔数最好是载体的 3-10 倍, 如果载体长度为 3000bp, 则所需插入 DNA 片段折合成重量(ng) = (插入 DNA 片段 bp 数 \times 50 ng \times N) \div 3000 bp。N 就是自己选定的插入 DNA 片段与载体的摩尔比。

2. 最后在每管中加入 1 uL 溶液 B, 轻柔吹打混合均匀后用微量离心机将液体全部甩到管底。
3. 室温放置至少 5 分钟, 最长可以放置过夜。

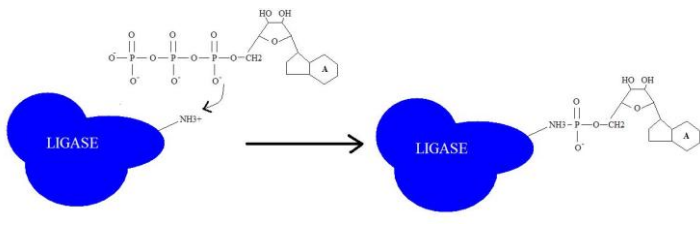
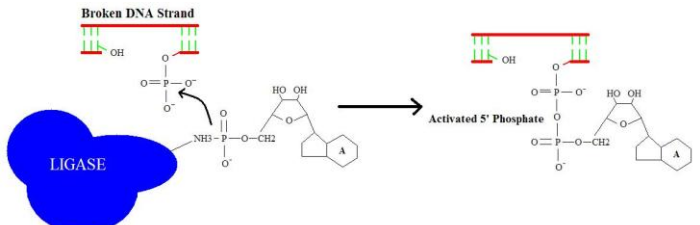
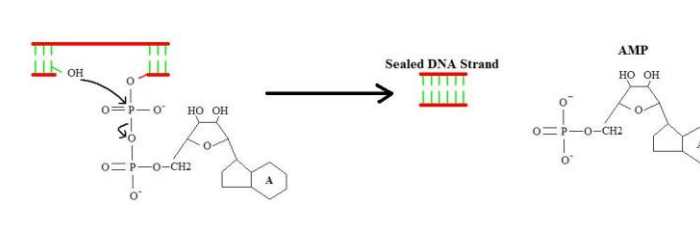
4. 70℃保温 10 分钟。此步可以灭活有关的酶，否则转化效率有所降低。
5. 根据使用的转化方法，每管各取适量用于转化实验，余下的放置在 -20℃保存。

二：细菌转化及筛选（仅供参考，本产品不提供相关试剂）

6. 将 100 μL 转化效率在 1×10^8 cfu/μg 以上的感受态细胞于冰上解冻。
7. 取 5-10 μL 连接产物加入到感受态细胞中，轻轻旋转几次以混匀。
8. 在冰上放置 30 分钟。
9. 将离心管放 42℃热休克 90 秒，然后快速将其转移到冰浴中放置 1~2 分钟。
10. 每管中加 900 μL LB 培养基，37℃振荡培养 1 小时复苏细胞。
11. 将 100 uL 复苏涂布到含 Amp 的 LB 琼脂平板上（根据载体情况也可能需要加上 X-gal 和 IPTG）。
12. 室温 4,000 rpm 离心剩余的 900 uL 复苏细胞 5 分钟，弃去 800 μL 上清，用剩余 100 μL 培养基重悬细胞并涂布到含 Amp 的 LB 琼脂平板上（可加 X-gal、IPTG）。
13. 将平板置于室温直至液体被吸收。此步非常重要，否则培养板将在 37℃排除水分，细菌将随水在培养基上到处游动，不能形成单个菌落。
14. 倒置平皿，于 37℃培养，12~16 小时后可出现菌落。一般情况下阳性对照组会有上千个菌落（100 uL 转化液产生的菌落数 \times 10），自联对照只有少数几个菌落，样品组的菌落数取决于 PCR 回收片段的质量。
15. 按常规方法筛选重组子。

技术资料

DNA 连接酶催化 DNA 连接的分子机制

| | |
|--|--|
| <p>1: Ligase 的 Lysine 基团与 ATP 或 NAD 反应, 形成 Ligase - AMP 复合物。</p> |  |
| <p>2: AMP 转移到 DNA 的 5'-P 并使 DNA 激活, 变成 DNA - AMP。</p> |  |
| <p>3: 另一端的 3'-OH 与 DNA-AMP 反应, 形成磷酸二脂键, 释放出 AMP。</p> |  |