

超快速DNA连接试剂盒(试用装)

产品编号	产品名称	包装
D7001FT	超快速DNA连接试剂盒(试用装)	10次
D7001S	超快速DNA连接试剂盒	100次
D7001M	超快速DNA连接试剂盒	500次

产品简介:

- 超快速DNA连接试剂盒(Instant DNA Ligation Kit), 也被称为瞬时DNA连接试剂盒或即时DNA连接试剂盒, 是碧云天研发的一种把粘末端或平末端DNA片段在室温(20-25°C)短至0-1分钟内快速插入到载体(Vector)中的连接试剂盒。同时本试剂盒也可以用于其它各种常规的双链DNA连接反应。
- 本试剂盒可以用于PCR片段和载体的连接、酶切产物和载体的连接、linker和载体的连接、linker和linker的连接等各种双链DNA的连接。
- 为了获得快速高效的连接效果, 本试剂盒采用了一种特殊的高活力Instant T4 DNA Ligase以及相应的Instant Ligation Buffer。通常连接0-1分钟和连接60min的效果相近。本试剂盒用于双平端片段插入到pUC18载体的连接, 后续转化DH5 α 感受态细胞后涂板获得的LB平板的实测效果参考图1A, 菌落PCR鉴定结果参考图1B。

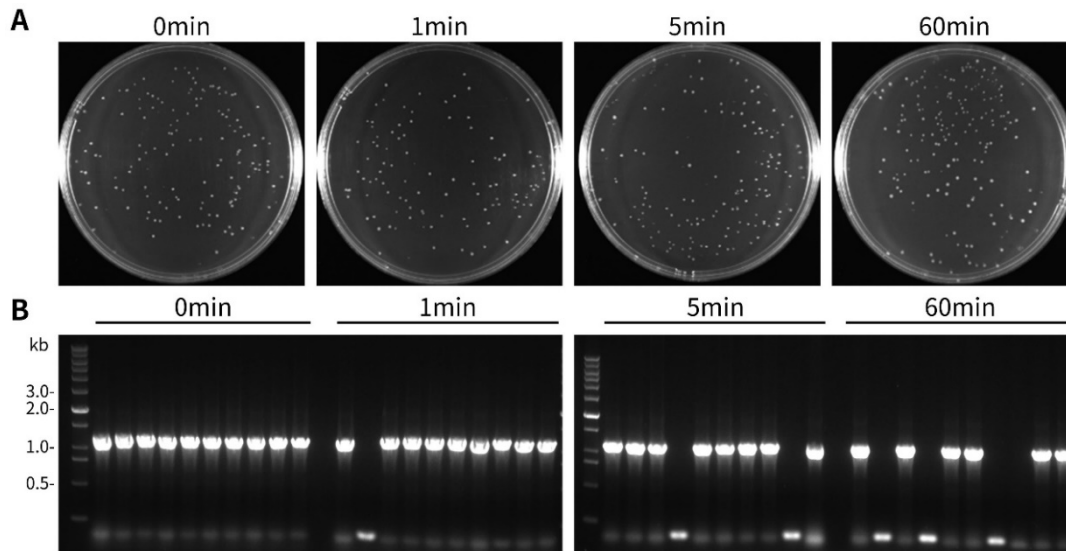


图1. 碧云天超快速DNA连接试剂盒(D7001)用于平末端DNA连接的效果图。本试剂盒用于平末端片段插入到载体的连接, 随后转化涂板的效果见图A。在20 μ l反应体系中, 将SmaI单酶切线性化并用D7028 Antarctic Phosphatase (Thermosensitive)去除末端磷酸根的载体pUC18与PCR扩增的1100bp双平端DNA片段混合(载体与DNA片段的摩尔比为1:3), 然后加入4 μ l的5X Instant Ligation Buffer, 1 μ l Instant T4 DNA Ligase, 并用水补足至20 μ l, 室温反应0min、1min、5min、60min。然后取10 μ l转化到100 μ l的DH5 α 感受态细胞中, 随后涂板。如图所示, 连接0、1、5或60min后转化后得到的克隆数相近。菌落PCR鉴定使用本试剂盒连接获得的克隆效果见图B。菌落PCR引物为M13 forward sequencing primer (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')和M13 reverse sequencing primer (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')。如图所示, 0min连接阳性率可达100%, 连接时间越长, 阳性率略有减少趋势, 连接60min后, 阳性率达60%。实际检测效果会因实验条件的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 在确保连接效果的同时, 确保完成连接后不必进行任何纯化即可直接转化细菌。另外, Instant Ligation Buffer中已经含有ATP、镁离子等各种必需物质, 无需再添加其它任何试剂。
- 本试剂盒用于总体积为10 μ l的连接体系时, 小包装和中包装分别可以进行100个和500个连接反应; 用于总体积为20 μ l的连接体系时, 小包装和中包装分别可以进行50个和250个连接反应。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7001FT-1	Instant Ligation Buffer (5X)	25 μ l
D7001FT-2	Instant T4 DNA Ligase	5 μ l

—	说明书	1份
---	-----	----

产品编号	产品名称	包装
D7001S-1	Instant Ligation Buffer (5X)	250µl
D7001S-2	Instant T4 DNA Ligase	50µl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7001M-1	Instant Ligation Buffer (5X)	1.25ml
D7001M-2	Instant T4 DNA Ligase	250µl
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，至少一年有效。

注意事项：

- 连接反应完成后即可直接转化细菌，请勿加热失活Instant T4 DNA Ligase。加热处理会导致后续的转化效率显著下降。
- 对于载体单酶切插入外源片段的情况，需注意对载体使用磷酸酶，如D7028 Antarctic Phosphatase (Thermosensitive)或D7027 BeyoAP Alkaline Phosphatase进行脱磷处理，以避免质粒自连。
- Instant Ligation Buffer (5X)使用前一定要完全溶解并混匀，加入到连接体系后也须注意混匀。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. PCR产物或酶切片段和普通载体的连接。

- 取1-2µg载体酶切过夜，或至少酶切3-5小时以上。尽量确保酶切充分，否则后续会导致产生很多自连的克隆。
注：如果载体进行的是单酶切，请务必进行去磷酸化处理，推荐使用碧云天的Antarctic Phosphatase (Thermosensitive) (D7028)或BeyoAP Alkaline Phosphatase (D7027)，避免后续产生很多自连的克隆。
- 载体酶切或去磷酸化完毕后，可以使用试剂盒进行纯化，例如碧云天的BeyoMag™磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒(D0041)或PCR纯化试剂盒/DNA纯化试剂盒(D0033)。也可以采用常规的酚氯仿抽提乙醇沉淀方法纯化载体。对于酶切产生较大片段(大于50-60bp)的情况推荐采用切胶回收的方式。
- 对于PCR产物：PCR产物凝胶电泳后，切胶回收预期大小的DNA片段。凝胶中DNA片段的回收可以使用试剂盒进行操作，例如碧云天的BeyoMag™磁珠法DNA凝胶回收试剂盒(D0043)或DNA凝胶回收试剂盒(D0056)。也可以采用反复冻融等方法回收DNA片段。
- 对于回收的PCR产物或DNA片段，用适当内切酶酶切，随后纯化酶切产物。
注：这一步的酶切不必酶切特别充分，通常酶切效率能达到80-90%以上即可。即本步骤的酶切通常酶切1-2小时即可。酶切产物可使用试剂盒进行纯化，例如碧云天的BeyoMag™磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒(D0041)或PCR纯化试剂盒/DNA纯化试剂盒(D0033)。也可以采用常规的酚氯仿抽提乙醇沉淀方法纯化。
- 取约25-100ng经过酶切和纯化的载体，加入3倍摩尔数的待插入片段。参考下表设置连接反应体系。
注：很多时候由于载体量和待插入片段的量都比较少，在回收后很难定量。此时可以根据回收前电泳条带的亮度进行大致的估计。通常以DNA分子量标准的某一条带为参考，估计或通过灰度半定量目的条带和该参考条带的亮度的比例关系。然后再按照预计的纯化或凝胶回收时的得率计算出最终得到的载体量和待插入片段量的比例关系。超纯水推荐使用碧云天的ST876 BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)。

Reagent	Amount	Amount
Vector	25-50ng	50-100ng
Insert	3:1 (mole ratio) VS Vector	3:1 (mole ratio) VS Vector
Instant Ligation Buffer (5X)	2µl	4µl
Ultrapure Water	To 9.5µl	To 19µl
Instant T4 DNA Ligase	0.5µl	1µl
Total volume	10µl	20µl

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。
- 室温(20-25°C)孵育连接0-5分钟。通常连接0-5分钟即可达到最佳连接效率的80%以上，无需进行更长时间连接。并且不仅适用于双粘端DNA片段的连接，也兼容双平端DNA片段的连接。
- 随后即可直接取连接产物用于转化感受态细菌。

2. PCR产物和T载体的连接。

- PCR产物凝胶电泳后，切胶回收预期大小的DNA片段。凝胶中DNA片段的回收可以使用例如碧云天的BeyoMag™磁珠

法DNA凝胶回收试剂盒(D0043)或DNA凝胶回收试剂盒(D0056)等试剂盒,也可以采用反复冻融等方法回收DNA片段。

- b. 按照T载体的说明书取适量T载体,加入3倍摩尔数的待插入片段。参考下表设置连接反应体系。

注:很多时候由于载体量和PCR产物的量都比较少,在回收后很难定量。此时可以根据回收前电泳条带的亮度进行大致的估计。通常以DNA分子量标准的某一条带为参考,估计或通过灰度半定量目的条带和该参考条带的亮度的比例关系。然后再按照预计的纯化或凝胶回收时的得率计算出最终得到的载体量和PCR产物的量的比例关系。

Reagent	Amount	Amount
T vector	As recommended	As recommended
Insert	3:1 (mole ratio) VS Vector	3:1 (mole ratio) VS Vector
Instant Ligation Buffer (5X)	2 μ l	4 μ l
Ultrapure water	To 9.5 μ l	To 19 μ l
Instant T4 DNA Ligase	0.5 μ l	1 μ l
Total volume	10 μ l	20 μ l

- c. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀,室温离心数秒,使液体积聚于管底。
d. 室温(20-25 $^{\circ}$ C)孵育连接0-5分钟。通常连接0-5分钟即可达到最佳连接效率的80%以上,无需进行更长时间连接。
e. 随后即可直接取连接产物用于转化感受态细菌。

3. Linker或miRNA/RNAi/sgRNA等小RNA表达用DNA片段和载体的连接:

- a. 载体的酶切和纯化同步步骤1a和1b。
b. Linker或miRNA、RNAi、sgRNA等小RNA表达用DNA片段的退火可以选择适当的DNA退火缓冲液,例如碧云天的Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (D0251),进行退火反应。
c. 长度大于8bp的Linker或退火的小RNA表达用DNA片段,可以按照5:1至10:1的比例和载体进行连接反应。例如载体为0.03 μ mol,则插入片段可以为0.15至0.3 μ mol。长度小于8bp的linker,比例需调整为10:1以上。
d. 除插入片段的用量外,随后按照步骤1e-1h进行。

4. DNA自身环化的连接:

参考步骤1e,待插入片段换成适量的水即可。其余步骤按照步骤1f-1h进行。

5. 其它类型的DNA片段连接参考上述方法进行。

常见问题:

1. 连接反应后转化效率很低或阳性克隆非常少。

- a. 可能在加入Instant Ligation Buffer (5X)后没有充分混匀。
b. 可能感受态细菌转化效率太低,用质粒作为阳性对照同时检测感受态的转化效率。
c. 可以尝试提高载体或插入片段的纯度,也可以考虑适当提高载体或插入片段的用量。
d. 可能载体酶切不够充分,用未经连接的载体转化作为阴性对照。
e. 用存放DNA的溶液进行转化,作为阴性对照,检测感受态细菌是否存在问题。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7002	快速DNA连接试剂盒	100次
D7003	快速DNA连接试剂盒	500次
D7006	T4 DNA Ligase	40,000U
D7008	T4 DNA Ligase	200,000U
D7009S	Instant T4 DNA Ligase	40kU
D7009M	Instant T4 DNA Ligase	200kU
D7018S	PBCV-1 DNA Ligase	1250U
D7018M	PBCV-1 DNA Ligase	5kU
D7018L	PBCV-1 DNA Ligase	25kU
D7028S	Antarctic Phosphatase (Thermosensitive)	1000U
D7028M	Antarctic Phosphatase (Thermosensitive)	5000U
D7010S	Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒)	20次
D7010M	Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒)	100次
D0033	PCR纯化试剂盒/DNA纯化试剂盒	50次
D0056	DNA凝胶回收试剂盒	50次
D0041S	BeyoMag TM 磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒	50次
D0041M	BeyoMag TM 磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒	200次
D0043S	BeyoMag TM 磁珠法DNA凝胶回收试剂盒	50次
D0043M	BeyoMag TM 磁珠法DNA凝胶回收试剂盒	200次

