



DNA 快速连接试剂盒

一 试剂盒组成 (-20℃保存, 避免反复冻融)

| 组成 | PR2301 (30 次) | PR2302 (60 次) |
|--------------------------|---------------|---------------|
| 2x Rapid Ligation Buffer | 300ul | 600ul |
| T4 DNA 连接酶 | 30ul | 60ul |

二 主要特点和用途

本试剂盒可在室温(20℃) 10 分钟条件下,迅速完成 DNA 片段粘端或平滑端连接反应, 连接产物直接转化。可用于 DNA 片段克隆,文库构建,TA 克隆,Linker 连接等。

三 操作步骤

快速连接反应:

1. 建立反应体系如下:

| | |
|----------------------------|--------------------------------------|
| 2 × Rapid Ligation Buffer | 10ul |
| Vector DNA | 50~100 ng |
| Insert DNA | ~3 molar ratio of Vector DNA(3 倍摩尔量) |
| T4 DNA ligase (5 units/ul) | 1ul |
| ddH ₂ O | Add to 20ul Total volume |

2. 充分混匀,瞬时离心将液体甩到管底.

3. 室温 (25℃)反应 10-15 分钟.延长时间并不明显增加连接效果.

4. 可直接转化感受态细菌,或-20℃冻存.

5. 取 2-5 ul 冷却的快速连接混合物,加入自制或购买的感受态细胞,混匀.根据所用菌株和感受态细菌制备方法,选用相匹配的方法进行转化.

说明:

1. 在 20ul 反应体系内载体 DNA 约为 50-100 ng.插入 DNA 片段的量约为载体片段的 3 倍摩尔量.总的载体和插入片段 DNA 浓度应在 1-10 ng/ul 之间.过多的 DNA 常常会增加阴性克隆本底.如不能确定 DNA 片段浓度,可以不同的比例做几个连接反应.

2. 转化前不要热灭活连接酶,否则将降低转化效率.

3. 转化时加入<5ul 的快速连接反应物,否则将降低转化效率.

4. DNA 片段体积大于 10ul 的,可相应增加 2× Rapid Ligation Buffer 和总反应体积, 同样 DNA 连接酶的量也要加大.