

快速DNA连接试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D7002	快速DNA连接试剂盒	100次

产品简介:

- 快速DNA连接试剂盒(Rapid DNA Ligation Kit) 是碧云天研发的一种把DNA片段在短至5-10分钟内快速插入到载体(vector)中的连接试剂盒。对于双粘端DNA片段的插入仅需5-10分钟即可完成, 对于双平端DNA片段的插入仅需15分钟即可完成。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。连接30分钟即可达到最佳效果, 与连接过夜的效果一致。
- 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Rapid T4 DNA Ligase以及相应的快速连接缓冲液, 确保在短时间内可以获得很好的连接效果。连接30分钟和连接过夜的效果相当, 通常只须连接5-10分钟即可满足常规用途(图1)。

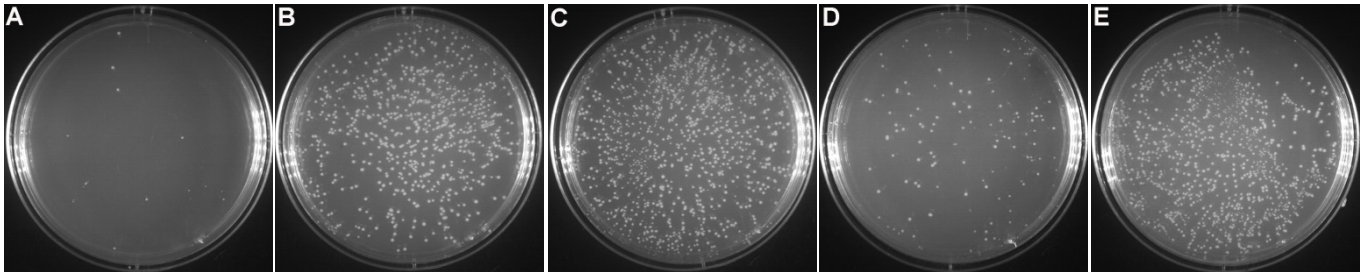


图1.快速DNA连接试剂盒实测效果图。双酶切后的载体室温自连30min(A)或16°C自连过夜(D)作为阴性对照; 双酶切后的载体与待插入片段室温连接10min(B)、30min(C)或者16°C连接过夜(E), 随后转化细菌涂板, 并于第二天取平板观察拍照。

- 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, 快速连接缓冲液中已经含有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的连接体系时可以进行100个连接反应, 用于总体积为20 μ l的连接体系时可以进行50个连接反应。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7002-1	快速连接缓冲液(2X)	0.5ml
D7002-2	Rapid T4 DNA ligase	50 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存。

注意事项:

- 连接反应完成后即可直接转化细菌, 请勿采用加热方法失活Rapid 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, 需注意对载体进行脱磷处理, 以避免质粒自连。
- 快速连接缓冲液(2X)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1-2 μ g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。
- 载体酶切完毕后, 可以使用试剂盒进行纯化, 例如碧云天的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产物或其它需酶切的质粒或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。酶切产物可以使用试剂盒进行纯化，例如碧云天的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。

- e. 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您的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。

载体	约25-50ng	约50-100ng
待插入片段	约载体摩尔数的3倍	约载体摩尔数的3倍
快速连接缓冲液(2X)	5 μ l	10 μ l
双蒸水或Milli-Q水	至9.5 μ l	至19 μ l
Rapid T4 DNA ligase	0.5 μ l	1 μ l
总体积	10 μ l	20 μ l

- f. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体体积聚于管底。

- g. 室温(25 $^{\circ}$ C)孵育连接5-10分钟或更长时间。对于双平端连接需室温(25 $^{\circ}$ C)孵育15-30分钟或更长时间。

注1：对于双粘端连接：室温孵育5-10分钟通常可以达到孵育更长时间所能达到最佳连接效率的70%以上。室温孵育30分钟和16 $^{\circ}$ C孵育过夜相比，无显著差异。连接5-10分钟后，如果转化等后续步骤还没有准备好，完全可以适当延长连接时间。但通常不宜超过60分钟。如果可能超过60分钟，可以在4 $^{\circ}$ C或16 $^{\circ}$ C放置较长时间甚至过夜。

注2：对于双平端连接：室温孵育15分钟通常可以达到孵育更长时间所能达到最佳连接效率的70%以上。室温孵育60分钟和16 $^{\circ}$ C孵育过夜相比，无显著差异。连接15分钟后，如果转化等后续步骤还没有准备好，完全可以适当延长连接时间。但通常不宜超过60分钟。如果可能超过60分钟，可以在4 $^{\circ}$ C或16 $^{\circ}$ C放置较长时间甚至过夜。

注3：上述室温连接效率的数据在25 $^{\circ}$ C时获得，在20-27 $^{\circ}$ C时获得的连接效率比较接近。室温较低或较高时推荐在25 $^{\circ}$ C水浴进行连接。

- h. 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：

- a. 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。

- 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您的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。

T载体	适量	适量
待插入片段	约载体摩尔数的3倍	约载体摩尔数的3倍
快速连接缓冲液(2X)	5 μ l	10 μ l
双蒸水或Milli-Q水	至9.5 μ l	至19 μ l
Rapid T4 DNA ligase	0.5 μ l	1 μ l
总体积	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，使液体体积聚于管底。

- d. 室温孵育5-10分钟或更长时间。

注：室温孵育5-10分钟通常可以达到孵育更长时间所能达到最佳连接效率的70%以上。室温孵育30分钟和16 $^{\circ}$ C孵育过夜相比，无显著差异。连接5-10分钟后，如果转化等后续步骤还没有准备好，完全可以适当延长室温的连接时间。但通常不宜超过60分钟。如果可能超过60分钟，可以在4 $^{\circ}$ C或16 $^{\circ}$ C放置较长时间甚至过夜。

- e. 随后即可直接取连接产物用于转化感受态细菌。

3. Linker或RNAi片段和载体的连接：

- a. 载体的酶切和纯化同步骤1a和1b。

- b. Linker或RNAi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RNAi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0.03pmol，则插入片段可以为0.15至0.3pmol。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. 可能在加入快速连接缓冲液(2X)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。对于平端连接需注意适当延长连接时间。
- 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。

使用本产品的文献：

1. Shi Y, Huang H, Deng X, He X, Yang J, Yang H, Shi L, Mei L, Gao J, Zhou N. Identification and functional characterization of two orphan G-protein-coupled receptors for adipokinetic hormones from silkworm *Bombyx mori*. *J Biol Chem*. 2011 Dec 9;286(49):42390-402.
2. Yang J, Huang H, Yang H, He X, Jiang X, Shi Y, Alatangale D, Shi L, Zhou N. Specific activation of the G protein-coupled receptor BNGR-A21 by the neuropeptide corazonin from the silkworm, *Bombyx mori*, dually couples to the G(q) and G(s) signaling cascades. *J Biol Chem*. 2013 Apr 26;288(17):11662-75.
3. Deng X, Yang H, He X, Liao Y, Zheng C, Zhou Q, Zhu C, Zhang G, Gao J, Zhou N. Activation of *Bombyx* neuropeptide G protein-coupled receptor A4 via a G α i-dependent signaling pathway by direct interaction with neuropeptide F from silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2014 Feb;45:77-88.
4. Chen X, Zheng C, Qian J, Sutton SW, Wang Z, Lv J, Liu C, Zhou N. Involvement of β -arrestin-2 and clathrin in agonist-mediated internalization of the human cannabinoid CB2 receptor. *Curr Mol Pharmacol*. 2014;7(1):67-80.
5. Yang W, X Dai, M Liu. Development of an Indirect Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assays Method Based on Immunomagnetic-bead for Analyzing *Listeria monocytogenes* in Food. *Am J Food Technol*. 2016;11(3):100-107.
6. Wang T, Yang Z, Zhou N, Sun L, Lv Z, Wu C. Identification and functional characterisation of 5-HT4 receptor in sea cucumber *Apostichopus japonicus*(Selenka). *Sci Rep*. 2017 Jan 6;7:40247.
7. Shen Z, Chen Y, Hong L, Cui Z, Yang H, He X, Shi Y, Shi L, Han F, Zhou N. BNGR-A25L and -A27 are two functional G protein-coupled receptors for CAPA periviscerokinin neuropeptides in the silkworm *Bombyx mori*. *J Biol Chem*. 2017 Oct 6;292(40):16554-16570.
8. Shen Z, Yang X, Chen Y, Shi L. CAPA periviscerokinin-mediated activation of MAPK/ERK signaling through Gq-PLC-PKC-dependent cascade and reciprocal ERK activation-dependent internalized kinetics of Bom-CAPA-PVK receptor 2. *INSECT BIOCHEM MOLEC*. 2018 Jul;98:1-15.
9. Wang T, Liang J, Xiang X, Chen X, Zhang B, Zhou N, Huang W, Yang J. Pharmacological characterization, cellular localization and expression profile of NPY receptor subtypes Y2 and Y7 in large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *COMP BIOCHEM PHYS B*. 2019 Dec;238:110347.

Version 2021.09.01