

# Quick Ligation Kit

目录号: RK20500

规格: 50 RXN / 200 RXN (20  $\mu$ L/RXN)

产品组成:

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Quick Ligase             | RM21502 |
| 2X Quick Ligation Buffer | RM20107 |

## 产品说明

Quick Ligation Kit 包含高效的连接酶和连接反应缓冲液。快速连接试剂盒在室温(25°C) 反应 5 min 完成粘性末端或平末端 DNA 片段的连接。本产品适用于克隆载体、文库构建、T / A 克隆、切口连接和线性 DNA 环化等。

## 反应条件

1X Quick Ligation Buffer, 25°C 反应

## 1X Quick Ligation Reaction Buffer 组成

66 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 7.5% Polyethylene glycol (PEG6000), pH 7.6 @ 25°C

## 保存温度

-20°C

## 操作说明

### 快速连接操作步骤

1. 在冰上按下表加入各反应组分, 以 4 kb 载体与 1 kb 插入片段连接反应为例:

| 组分                        | 加入量                 |
|---------------------------|---------------------|
| ddH <sub>2</sub> O        | Variable            |
| 2X Quick Ligation Buffer* | 10 $\mu$ L          |
| 线性化载体 DNA (4 kb)          | 50 ng (0.02 pmol)   |
| 插入 DNA 片段 (1 kb)**        | 37.5 ng (0.06 pmol) |
| Quick Ligase***           | 1 $\mu$ L           |
| 总体积                       | 20 $\mu$ L          |

\*, 注: 2X Quick Ligation Buffer 融解混匀后使用。

\*\* , 注: 根据插入 DNA 片段和载体分子量, 在反应体系中按 1: 3 的摩尔比加入载体和插入片段。

\*\*\*, 注: Quick Ligase 在反应体系中应最后加入。

2. 使用移液器吹打并瞬时离心混匀上述反应体系。
3. 置于室温 (25°C) 反应 5 min。
4. 可以取 1-5  $\mu$ L 连接产物转化到 50  $\mu$ L 感受态细胞中, 或者将连接产物置于 -20°C 保存。
5. 注意: 不要通过热失活终止连接反应, 否则会显著降低转化效率。

## 注意事项

确保成功连接与转化的关键因素如下:

### 1. 感受态细胞

不同状态的感受态细胞转化效率可能有数量级差异; 连接效率与感受态细胞状态呈正相关; 转化未酶切质粒作为对照可以验证感受态细胞的转化效率。

### 2. 电穿孔转化

电转化能数量级的增加转化效率, 但 Quick Ligation Kit 的连接产物需纯化后才能进行电转化。

### 3. DNA

用于连接反应的 DNA 在纯化时, 需用 ddH<sub>2</sub>O (Milli-Q™ 水或同档次水更优)、TE 或其他不影响连接反应的稀释缓冲液洗脱; 向反应体系中加入 2X Quick Ligation Buffer 前, 最佳的载体 DNA 与插入 DNA 片段的总体积为 10  $\mu$ L; 当载体 DNA 与插入 DNA 片段的体积超过 10  $\mu$ L 时, 保持加入的 2X Quick Ligation Buffer 为反应总体积的 50%, 同时按比例增加连接酶体积; 对于高效连接反应, 尽量使载体与插入片段的 DNA 总浓度在 1-10  $\mu$ g/mL 之间; 对于单片段插入的连接反应, 插入片段/线性化载体摩尔比在 2-6 时, 连接效果最佳, 摩尔比低于 2 会显著降低连接效率, 摩尔比高于 6 会导致多片段连接的副反应, 如果 DNA 浓度不确定 (即摩尔比不确定), 可能会因为摩尔比的不同, 导致产生不同的连接产物。

### 4. 孵育时间

使用 DNA Quick Ligation Kit, 大多数的连接反应条件为 25°C 5 min 或更短时间, 连接反应超过 5 min 并不能增加连接效率。实际上, 连接反应时间超过 1 hr 转化效率会开始下降, 如果连接反应时间过夜, 转化效率最多会降低 75%。

### 5. 生物学因素

某些 DNA 结构, 例如反向和串联重复的 DNA 结构, 会被大肠杆菌选择性排斥; 某些重组蛋白可能存在一定的细胞毒性而不能被大肠杆菌很好地耐受, 导致转化效果差或菌落较小。