

产品概述

Super Ligation Master Mix 是一种 T4 DNA Ligase 和 Buffer 混合的即用型 2×预混液, 催化双链 DNA 或 RNA 上相邻的 5' 磷酸末端和 3' 羟基末端形成磷酸二酯键。适用于黏性末端、平末端和单碱基突出末端的 DNA 连接, 以及 Linker 或 Adapter 连接。16°C 反应 30 min 即可快速连接, 连接产物可直接转化多种化学感受态细胞。

规格

Components	BR1C302-01 20 T	BR1C302-02 50 T	BR1C302-03 100T
Super Ligation Master Mix	0.1 mL	0.25 mL	0.5 mL

保存条件

-20±5°C 存储。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途, 不用于临床诊断。
2. 使用前应混匀, 避免反复冻融。
3. 通常调整载体用量 (0.03 pmol) = [0.02 × 载体碱基对数] ng, 插入片段用量 (0.09 pmol) = [0.06 × 插入片段碱基对数] ng。
4. 为确保加样的准确性, 在配置连接体系前可将线性化载体和插入片段适当稀释, 各组分加样量不低于 1 μL。
5. 反应结束后置于冰上, 立即转化。若不能及时转化, 可置于 -20°C 保存。

实验流程

连接反应

连接反应体系配置: 建议于冰上配置。

Components	Volume per Reaction
Super Ligation Master Mix	5 μL
Linearized Vector	X μL
Insert Fragment	Y μL
ddH ₂ O	To 10 μL

表格中的 X, Y 分别表示根据公式计算的线性化载体和插入片段的最适用量。为确保加样体积准确, 建议对浓度较高的样品进行适当稀释, 确保各组分的加样量不低于 1 μL, 从而减少加样误差。

线性化载体和插入片段的用量计算: 通常线性化载体的用量是 0.03 pmol, 插入片段的用量为 0.03-0.3 pmol, 具体的用量可参考下表中的公式粗略计算, 摩尔比 (载体: 片段) 为 1: 1 到 1: 10, 推荐最适摩尔比为 1: 3。大片段可适当提高片段的比例。

组分	最适量 (ng)	最适量 (pmol)	摩尔比 (载体: 片段)
线性化载体	[0.02 × 载体碱基对数] ng	0.03 pmol	1: 3
插入片段	[0.06 × 片段碱基对数] ng	0.09 pmol	

连接体系反应条件:

常规反应条件	可选优化范围
16°C, 30 min	16°C, 30 min-3 h
	25°C, 5 min
	4°C, 过夜

连接产物转化

1. 将感受态细胞至于冰上解冻。
2. 取 5-10 μL 连接产物加入到 100 μL 的感受态细胞中, 轻弹管壁混匀 (请勿剧烈震荡), 冰上静置 30 min (部分感受态细胞只需冰浴 25 min)。重组产物转化体积不应超过感受态细胞体积的 1/10。
3. 42°C 水浴热激 30 s (具体热激时间因感受态细胞种类不同有所差异, 具体以感受态细胞说明书提供的热激时间为准), 立即置于冰上冰浴 2-3 min。
4. 加入 900 μL 无抗 LB 液体培养基, 37°C, 200-250 rpm 摇菌 1 h。
5. 5000 rpm 离心 5 min, 于超净台中弃 900 μL 上清, 剩余培养基重悬离心后的菌体, 涂布在载体对应抗性的 LB 固体平板, 于 37°C 培养箱中倒置培养 12-16 h。

阳性克隆鉴定

菌落 PCR: 挑单克隆至 10 μL 无菌纯水中作为扩增模板, 使用合适的正反向引物进行扩增, 建议至少 1 条引物是载体上的引物。

酶切鉴定: 挑取单克隆至含抗性的 LB 液体培养基中过夜培养并提取质粒, 选择载体上合适的双酶切位点进行酶切, 电泳检测酶切后的片段大小是否和理论相符, 从而判断阳性克隆。

测序鉴定: 挑取单克隆至含抗性的 LB 液体培养基中进行培养, 可选择菌液或者菌液提取的质粒样品送测序, 建议至少 1 条测序引物是载体上的, 将测序结果和理论序列进行比对, 从而判断阳性克隆。同时可检查构建过程中是否引入突变。

常见问题与解决方案

平板上无转化子或数量很少

1. 末端不匹配: 酶切后产生平末端与黏性末端混接或黏性末端碱基错配, 双酶切后电泳切胶回收, 确保插入片段与载体末端酶切位点一致, 双酶切位点需要与载体多克隆位点 (MCS) 完全匹配且方向正确, 若匹配错误, 片段将无法正确插入载体。
2. 插入片段与载体比例失衡: 优化连接比例, 摩尔比 (载体: 片段) 为 1: 1 到 1: 10, 推荐最适摩尔比为 1: 3。大片段可适当提高片段的比例。
3. 载体质量低: 载体酶切后加热失活内切酶, 避免内切酶残留破坏连接产物。
4. 连接效率低: 尝试低温 16°C 连接 3 h, 注意保持低温状态, 通过延长反应时间, 增加底物的连接效率。
5. 感受态细胞转化效率低: 感受态细胞转化效率应大于 10^7 cfu/ μg 。

无阳性克隆或者假阳性高

1. 载体双酶切不彻底: 可采用分步酶切。优化酶切缓冲液体系, 如使用兼容性缓冲液 CutSmart Buffer。可采用凝胶验证策略, 实验时设置单酶切、双酶切和未酶切三组对照, 通过电泳条带差异判定酶切结果。
2. 双酶切位点距离不合适: 两酶切位点之间需要预留安全距离, 位点间隔至少 10 bp。
3. 载体自连: 载体双酶切后用碱性磷酸酶 (如 CIP) 处理线性化的载体, 去除 5' 端磷酸基团, 彻底阻断自连。注意检查载体双酶切所使用的酶切位点是否为同尾酶。
4. 片段扩增引物不合理: 确保引物末端含 5' 保护碱基+酶切位点。避免引物二聚体或发卡结构。