

酶切连接

酶切连接是经典的质粒构建方法, 实验室使用 NEB 的限制性内切酶, Thermo 的 T4 连接酶, 本 Protocol 参照相应说明书

酶切反应 50 μ L 体系

1. 根据所使用载体, 选择合适的限制酶, 查表, 确定其浓度和所需要的 Buffer

! 双酶切反应只有在相同 Buffer 条件下才能同时进行, 否则需要连续两步酶切和纯化

! 所使用的 DH5 α 是 Dam⁺菌株, 其可以用 DpnI 酶切, 但不建议使用 XbaI

! 酶切用的 PCR 引物注意需要保护碱基, 可以直接设计为 Infusion 引物, 这样既可以做酶切连接又可以 Infusion

限制酶	切割位点	NEB 货号	Buffer	浓度	甲基敏感性
BamHI	G↓GATCC	R0136	NEBuffer 3.1	20,000 units/mL	不敏感
BamHI-HF	G↓GATCC	R3136	rCutSmart Buffer	20,000 units/mL	不敏感
BglII	A↓GATCT	R0144	NEBuffer 3.1	10,000 units/mL	不敏感
EcoRI-HF	G↓AATTC	R3101	rCutSmart Buffer	20,000 units/mL	部分 CpG 甲基化
HindIII-HF	A↓AGCTT	R3104	rCutSmart Buffer	20,000 units/mL	不敏感
KpnI-HF	GGTAC↓C	R3142	rCutSmart Buffer	20,000 units/mL	不敏感
Sall-HF	G↓TCGAC	R3138	rCutSmart Buffer	20,000 units/mL	CpG 甲基化阻断
XhoI	C↓TCGAG	R0146	rCutSmart Buffer	20,000 units/mL	部分 CpG 甲基化
XbaI	T↓CTAGA	R0145	rCutSmart Buffer	20,000 units/mL	部分 dam 甲基化

2. 搭建 50 μ L 反应体系, 吸打混匀

试剂	用量
10 \times NEBuffer / 10 \times CutSmart Buffer	5 μ L
DNA Vector	1 mg
Enzymes	各 10 units (根据浓度使用 0.5 μ L 或 1 μ L)
H ₂ O	补齐至 50 μ L

! 酶取用时带冰盒, 从液面吸取

3. Parifilm 膜封口, 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 1-3h, 乃至过夜

4. 加入 DNA Loading Buffer, 琼脂糖核酸电泳 (参照不酶切的载体作为对照), 胶回收

! 另外, 无论 PCR 产物还是载体都尝试过在这一步直接 95 $^{\circ}$ C 金属浴 10 分钟, 使酶灭活, 随后带室温静置放凉后做下一步反应(T4 连接反应和 Infusion 均成功过), 此时浓度可以按照理论最大值计算(1mg/50 μ L=20ng/ μ L), 转化后涂板可以适当稀一点

去磷酸化体系 CIP (M0290 10000U/mL)

当载体为单酶切时, 为防止在连接过程中载体自连, 需要使用 5'去磷酸化酶 CIP 处理, 该酶在任何 NEB 的 Buffer 中都具有活性, 可以直接加入到酶切体系中

1. 在 20 μL 体系中加入 0.1 μL CIP (1 unit) / 在 50 μL 体系中, 加入 0.25 μL CIP, 37°C水浴 30 分钟

! 可以在酶切反应结束的前半小时加入 CIP

2. 胶回收之后再继续进行后续的连接反应

T4 连接 (Thermo)

1. 搭建 20 μL 连接反应体系

! T4 Buffer 中含有 dNTPs 等物质, 高浓度时可见白色沉淀, 务必完全化冻后混匀溶解后使用

20 μL 连接体系	用量
10 \times T4 Buffer	2 μL
载体	100 ng
片段	载体和片段的摩尔比应该是 1:5
T4 Ligase	0.2 μL
灭菌水	补齐至 20 μL

2. 22°C金属浴 10 分钟, 后可取 10 μL 进行转化

修订日期 2024-04-23