

cDNA 文库组标准流程五(cDNA 双链和载体的连接)

1.连接:

根据载体和 cDNA 的电泳定量结果, 每个样品设置 3 个比例的连接,

即: insert/vector=1/3 insert/vector=1/1 insert/vector=3/1

按以下体系依次加入:

ddH ₂ O	xul
T4 ligase 10x buffer	1ul
PBK(E/X)vector(20ng/ul)	1ul
cDNA	(由浓度及连接比例而定)
T4 DNA ligase(3U/ul)	1ul
Total	10ul

14℃, 连接过夜

2. 检测: (PCR 方法)

取适量 PCR 薄壁管, 置于冰上, 按以下体系依次加入:

连接产物 insert vector 阳性对照 阴性对照 (H₂O)

模板:	1	1	1	1	1
10xbuffer	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Mgcl ₂ (25mM)	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
DNTP(2.5mM)	1	1	1	1	1
T3 引物 (10pmol)	1	1	1	1	1
T7 引物 (10pmol)	1	1	1	1	1
Taq 酶	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
ddH ₂ O	16.3	16.3	16.3	16.3	16.3
total	25ul	25ul	25ul	25ul	25ul

各试剂均加好后, 离心机上甩一下, 使之沉底, 置于 PCR 仪上

反应程序: 94℃ 4 分钟

94℃ 20 秒

53.6℃ 20 秒 35 个循环

72℃ 4 分钟

72℃ 10 分钟

4℃ 24 小时

待 PCR 反应进入 4℃ 后，取下 PCR 薄壁管，取 7ulPCR 产物加入 3ul 溴芬兰跑电泳，同时上 1Kb DNA ladder

半小时后照相，观察胶图：insert、vector、阴性三个样品除了有少量引物带（大约在 200bp 左右）外，均无其他带形。阳性带形清晰。好的连接产物应在 500 至 4、5Kb 大小之内形成一条清晰的 smear。