

OK Clon DNA连接试剂盒 III Ver.2

OK Clon DNA Ligation Kit III Ver.2

Code No. AG11811

包装量: 10 rxns / 10 μ l
保存温度: -20 $^{\circ}$ C

产品概述

OK Clon DNA 连接试剂盒 III Ver.2 是一种简单、快速、高效的定向无缝克隆试剂盒，可以快速高效地将一段或多段 DNA 片段定向、无缝地克隆到任意载体的任意位置，而不被酶切位点限制。本产品作为新一代无缝克隆试剂盒，适用范围广，可高效连接不同大小的载体与插入片段，尤其适用于多片段无缝克隆。

DNA 连接反应是基于 OK Clon Enzyme II 的催化，将含有与载体两末端一致序列（15 ~ 20 bp）的片段准确、高效地插入到线性化载体中。只需在设计目的片段 PCR 引物时将与载体 5' 端互补的序列添加在引物 5' 端，通过该引物扩增目的片段，无需对 PCR 片段进行限制性酶切、磷酸化等处理，就可将目的片段插入载体中。

保存及运输

保存温度：-20 $^{\circ}$ C 保存

运输温度：干冰运输或 -20 $^{\circ}$ C 冰袋运输

产品组成

2.5X OK Clon Master Mix II	40 μ l
----------------------------	------------

注意事项

1. 建议线性化载体与插入片段经过纯化后再进行连接反应，高纯度的线性化载体与插入片段有助于得到更多的阳性克隆。
2. 实验所用的移液器及反应所需的温度都需进行校准，确保精确的加样量及准确的反应温度，以获得较高的连接效率。
3. 2.5X OK Clon Master Mix II 甘油浓度较高，使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液枪轻柔地吸打混匀，过程中尽量避免起泡，然后再进行使用。
4. 所有反应混合液需要在冰上配制。

实验操作

反应体系^{*1} (10 μ l)

组分名称	反应终浓度	加入量
2.5X OK Clon Master Mix II ^{*2}	1X	4 μ l
线性化载体	50 ng ~ 200 ng ^{*3}	- ^{*5}
n个插入片段 (n $\leq$ 5)	5 ng ~ 200 ng ^{*4}	- ^{*5}
RNase free water	-	Up to 10 μ l ^{*6}

*1: 在配制反应时，先将除 2.5X OK Clon Master Mix II 以外的组分配制成预混液；然后加入 2.5X OK Clon Master Mix II，为避免枪头中酶液的残留，可轻柔吹打 3 ~ 5 次；最后将配制完成的反应液充分吹打混匀；

*2: 为确保酶液加入量准确，取液时勿将枪头插入太深，避免酶液沾附于枪头外壁，导致加样体积不准确，造成实验结果不理想；

*3: 线性化载体的使用量可根据实际载体大小在 50 ng ~ 200 ng 范围内进行调整（一般情况下，载体用量越大，连接效果越好）。当载体 < 10 kb 时，可在 50 ng ~ 100 ng 内调整；当载体 $\geq$ 10 kb 时，可在 50 ng ~ 200 ng 内调整；

*4: 单个片段用量推荐 5 ng ~ 200 ng, 但片段的实际加入量需根据插入片段与载体的摩尔比进行添加, 可参考下表:

	片段长度 < 载体长度	片段长度 ≥ 载体长度
单个片段	2 : 1 (若插入片段 < 500 bp, 可在 2 : 1 ~ 5 : 1 范围 内进行调整)	1 : 1
多个片段	各片段与载体摩尔比建议 1 : 1 ~ 2 : 1	

注: 表格中所有比例均是插入片段与载体的摩尔比。

插入片段的用量计算可参考以下公式:

$$\text{插入片段用量 ng} = A \times \frac{B}{C} \times \text{载体用量 (ng)}.$$

A: 插入片段与载体的摩尔比;

B: 插入片段的大小 (bp);

C: 载体的大小 (bp)。

如: 将 1,000 bp 的片段插入 4,000 bp 的载体中, 载体加入量为 100 ng,

$$\text{则片段的加入量 ng} = 2 \times \frac{1000 \text{ bp}}{4000 \text{ bp}} \times 100 \text{ ng} = 50 \text{ ng}.$$

*5: 若使用公司产品 Linearized Control Vector & Insert (for OK Clon) (Code No. AG11814) 中的对照载体与插入片段, 建议各加 1 μl;

*6: 若载体与插入片段的总体积 > 6 μl, 可将 2.5X OK Clon Master Mix II 用量加倍, 并补加 RNase free water 至总体积为 20 μl。

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

反应程序^{*1}

连接反应类型	温度	时间
单个片段连接	50°C ^{*4}	10 min ^{*2}
多个片段连接	50°C ^{*4}	20 min ^{*3}

*1: 反应完成后, 应降至 4°C 或立即置于冰上冷却;

*2: 单个片段连接推荐反应 10 min, 如果连接效率较低, 可将反应时间适当延长至 20 min, 但最长建议不超过 30 min;

*3: 多个片段连接推荐反应 20 min, 如果连接效率较低, 可将反应时间适当延长至 40 min, 但最长建议不超过 1 h;

*4: 如果连接效率低或者克隆阳性率低, 可尝试降低反应温度, 温度可在 45°C ~ 50°C 范围内调整。

转化

【以 *E. coli* HST08 Competent cells (Code No. AG11804) 转化方法为例。某些感受态细胞转化方法可能略有差异, 请以相应感受态细胞的说明书为准。】

1. 感受态细胞于 -80°C 冰箱取出后于冰上融化 (注: 感受态细胞融化后不可久置, 不可反复冻融);
2. 取 2.5 ~ 5 μl 连接反应液加入至 100 μl 感受态细胞中, 轻柔混匀, 冰浴 30 min (注: 100 μl 感受态细胞不要添加超过 10 μl 的反应液, 反应液添加过多可能会降低转化效率);
3. 42°C 水浴热激 45 sec, 热激结束后迅速放于冰上静置 2 min;
4. 加入 900 μl 无抗 SOC 或 LB 培养基, 37°C 200 rpm 培养 1 h;
5. 取 100 μl 菌培养液均匀涂布于带有抗性的 LB 固体培养基上, 37°C 恒温箱倒置培养 ~16 h (注: 若菌落数较少, 可在涂板前将菌培养液于 6,000 rpm 离心 5 min, 弃掉 800 μl 上清, 用剩余培养基将菌体重悬, 再均匀涂布于带有抗性的 LB 固体培养基上);
6. 阳性克隆筛选。