

Version 1

Cat No. AG11802  
AG11803

# *OK Clon DNA 连接试剂盒*

## *OK Clon DNA Ligation Kit*

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.





## ➤ 产品概述

*OK Clon* DNA Ligation Kit 是一种准确、快速、高效的定向克隆试剂盒。本试剂盒可以在 10 分钟内，快速高效地将一段或多段 DNA 片段定向、无缝的克隆到任意载体的任意位置，而不被酶切位点限制。DNA 连接反应是基于 *OK Clon* Enzyme 3' – 5' 端的外切酶活性，从线性化 DNA 链的 3' 末端切割核苷酸形成粘性末端，由此，片段与载体末端能够形成 15 ~ 20 bp 的互补序列，通过退火可以准确、高效的将片段与载体连接。只需在设计引物时将与载体 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 片段进行限制酶切、磷酸化等处理，就可将目的片段插入载体中。

## ➤ 产品组成

组分名称	AG11802 ( 10 rxns / 10 μl )	AG11803 ( 50 rxns / 10 μl )
5X <i>OK Clon</i> Master Mix	20 μl	100 μl
Linearized Control vector ( 50 ng/ μl )	5 μl	5 μl
2 kb Positive Control Insert ( 80 ng/ μl )	5 μl	5 μl

## ➤ 保存

保存温度：-20°C

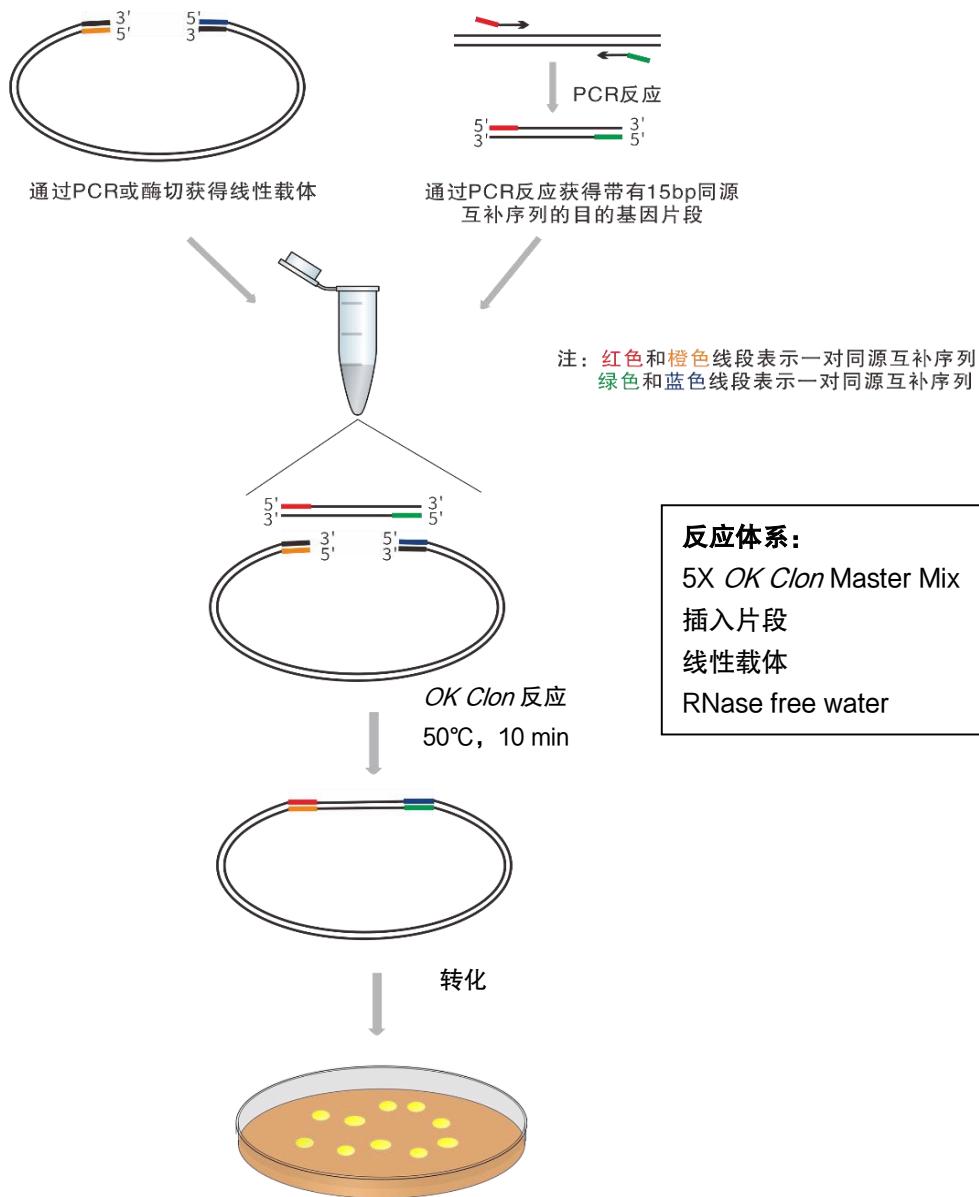
运输温度：干冰或-20°C冰袋运输

## ➤ 产品优势

1. 可将片段插入载体的任意位置，而不受酶切位点限制；
2. 反应迅速，50°C 10 min 即可完成连接反应；
3. 插入片段不需酶切处理，PCR 扩增完成后只需要进行纯化处理便可直接进行连接反应。



## ➤ 实验原理

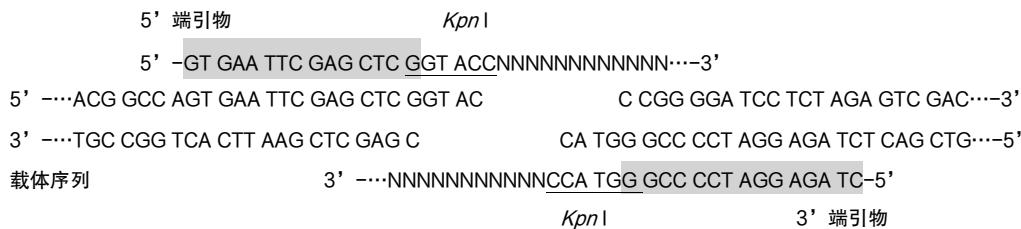


## ➤ 使用注意事项

- 建议线性载体与插入片段经过纯化后再进行连接反应，高纯度的线性载体与插入片段有助于得到更多的阳性克隆。
- 实验所用的移液器及反应所用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。
- 5X OK Clon Master Mix 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。
- 所有反应混合液需要在冰上配制。



#### ④ 载体末端为 3' 突出时，引物接头的设计（含酶切位点）：



注：引物序列中 N 表示特异性引物序列。灰色区域为添加的与载体同源序列接头。

#### **注意事项：**

- 在目的基因引物设计时，需在常规设计的引物 5' 端加入 15~20 bp 与载体 5' 末端同源互补的序列；如加入酶切位点，则多余的部分碱基不算入接头长度。
  - 进行多片段重组反应时，每个插入片段的上游引物 5' 端加入 15 bp 与前一个片段或载体 5' 末端互补的接头，下游引物 5' 端加入 15 bp 与下一个片段或载体 5' 末端互补的接头。

## 二、目的片段扩增：

可以选用高保真酶体系扩增目的片段，降低突变率。目的片段经过纯化后备用。

### 三、 线性化载体的制备：

可通过酶切或 PCR 扩增制备线性化载体。线性载体经过纯化后备用。

#### 四、连接反应：

**【反应体系配制】：**在冰上配制反应液。

反应体系<sup>\*1</sup> (10 μl)

组分名称	反应终浓度	加入量
5X OK Clon Master Mix <sup>*2</sup>	1X	2 μl
Linearized Vector	50 ng ~ 200 ng <sup>*3</sup>	— <sup>*5</sup>
Insert DNA fragment	5 ng ~ 200 ng <sup>*4</sup>	— <sup>*5</sup>
RNase free water	—	Up to 10 μl <sup>*6</sup>

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

\*2：为确保酶液添加准确，取液时勿将枪头插入太深，避免酶液挂外壁过多导致加液量不准，造成实验结果不理想；

\*3: Linearized Vector 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)。载体<10 kb 时，可在 50 ng~100 ng 内调整；载体≥10 kb 时，可在 50 ng~200 ng 内调整；

\*4: 片段用量推荐 5 ng ~ 200 ng，片段的加入量可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 2 : 1	

注：表格中所有比例均是插入片段与载体的摩尔比。

可根据 DNA 片段与载体的质量和长度粗略计算其摩尔比，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 1000 bp 的片段插入 4 000 bp 的载体中，载体加入量为 100 ng，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: 若使用本试剂盒内的对照载体与插入片段，建议各加 1 μl；

\*6: 若载体和插入片段加入体积较大时 (载体与插入片段的总体积 > 8 μl)，可将 5X OK Clon Master Mix 用量加倍，并补加 RNase free water 至总体积为 20 μl。

### 【反应程序】

温度	时间
50°C	10 min <sup>*2</sup>
冰上 or 4°C <sup>*1</sup>	-

\*1: 反应完成后，反应液可直接用于菌体转化。

\*2: 一般情况下，建议反应 10 min，如果连接效果不好，可在 8 min~10 min 范围内调整，优化反应效率。对于比较复杂的接头 (如接头 GC 含量较高)，可尝试延长反应时间至 12 min；对于简单的接头 (如 AT 含量较高)，可尝试降低反应时间至 8 min。



## 五、转化

【以化学感受态细胞 *E.coli* JM109 Competent cells (Code. AG11805) 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 5 μl 连接反应液加入至 100 μl 感受态细胞中混匀，冰浴 30 min（注：100 μl 感受态细胞不要添加多于 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 45 sec；
- ④ 水浴加热后迅速置于冰上 2 min；
- ⑤ 加入 900 μl SOC 培养基，37°C 200 rpm 培养 1 h；
- ⑥ 取 100 μl 菌培养液均匀涂布于带有抗性的固体培养基上，37°C 恒温箱倒置培养 ~16 h；
- ⑦ 阳性克隆筛选。

## ➤ 实验例

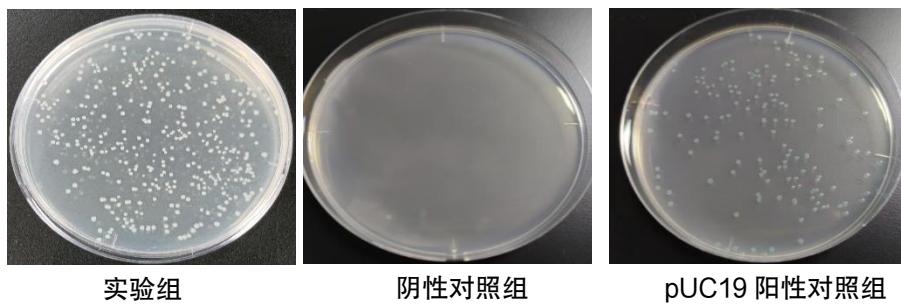
### 1. 本试剂盒中载体与片段的克隆实验

#### 1) 按照下表配制反应体系：

组分名称	实验组	阴性对照	阳性对照 <sup>*1</sup>
5X OK Clon Master Mix	2 μl	2 μl	2 μl
Linearized Control vector (50ng/μl)	1 μl	1 μl	-
2 kb Positive Control Insert (80ng/μl)	1 μl	-	-
RNase free water	6 μl	7 μl	Up to 10 μl

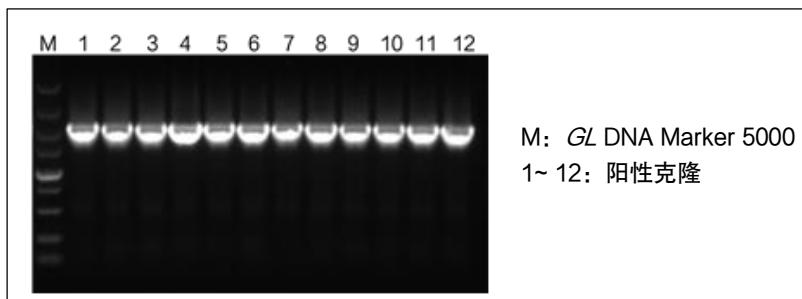
\*1：阳性对照仅加入 100 pg 环状的 pUC19 质粒。不加线性化载体与片段。

#### 2) 将所有组别转化至 *E.coli* JM109 Competent cells (Code. AG11805)，培养的菌悬浮液稀释 5 倍后，100 μl 涂布平板。结果如下图所示，实验组的菌落均匀，得到数百个单克隆菌落。





- 3) 挑取实验组的 12 个单菌落，进行菌落 PCR 验证。从下图电泳结果可看出，所挑取 12 个菌落均为阳性菌落。



- 4) 将菌落 PCR 验证为阳性的 12 个菌落进行质粒提取后测序，序列正确无误。

## ➤ 产品注意事项

### 1. 高质量的 DNA

- ❖ 对 *OK Clon* 反应来说，高质量的 DNA 片段是有必要的。DNA 片段与载体质量不佳时，会造成连接效率低下，可考虑选用合适的纯化试剂或采用乙醇沉淀等方法获得高纯度的 DNA。
- ❖ 在进行 PCR 反应扩增 DNA 目的片段时，需要确保 DNA 条带的特异性，不能出现杂带或弥散带，必要时需要进行琼脂糖凝胶回收，以确保连接时无其他片段的干扰。
- ❖ 载体酶切线性化要充分，环状载体会造成克隆出现假阳性。载体线性化不完全时，建议优化酶切体系。
- ❖ 经反向 PCR 线性化的载体，建议进行 PCR 产物回收或琼脂糖凝胶回收以获得特异性的线性化载体。

### 2. 合适的引物

- ❖ 确保插入片段的引物接头与载体末端序列互补，且互补序列长度达到 15~20 bp。
- ❖ 推荐在引物合成时选用 PAGE 或 HPLC 纯化，可提高克隆成功率。
- ❖ 建议接头的 GC 含量 40~60% 之间。

### 3. 合适的载体与片段的添加比例

- ❖ 片段与载体的用量过低或者比例不佳，可能会造成连接效率降低。可按照说明书中推荐的 DNA 用量、比例配制反应体系，并根据实验结果进行优化。

### 4. 正确的使用试剂

- ❖ 若载体和插入片段加入体积较大时（载体与插入片段的总体积 > 8 μl），可将 5X *OK Clon Master Mix* 用量加倍，并补加 RNase free water 至总体积为 20 μl。



- ❖ 转化时，100 μl 感受态细胞不要添加多于 10 μl 的反应液，反应液添加过多可能会降低转化效率。
- ❖ 转化采用合适的感受态细胞，确保高的转化效率。如在进行转化实验时，可增加一组环状质粒的阳性对照组，计算转化效率。感受态细胞在运输及储藏中，一旦融化将对细胞产生极大的伤害从而影响转化效率。