Version 2

Code 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.

ACCURATE BIOLOGY 艾科瑞生物

➢ 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。本产品可以在 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 μ l)	AG11803 (50 rxns / 10 μ l)
5X *OK Clon* Master Mix	20 μ l	100 μ l

➢ 保存及运输

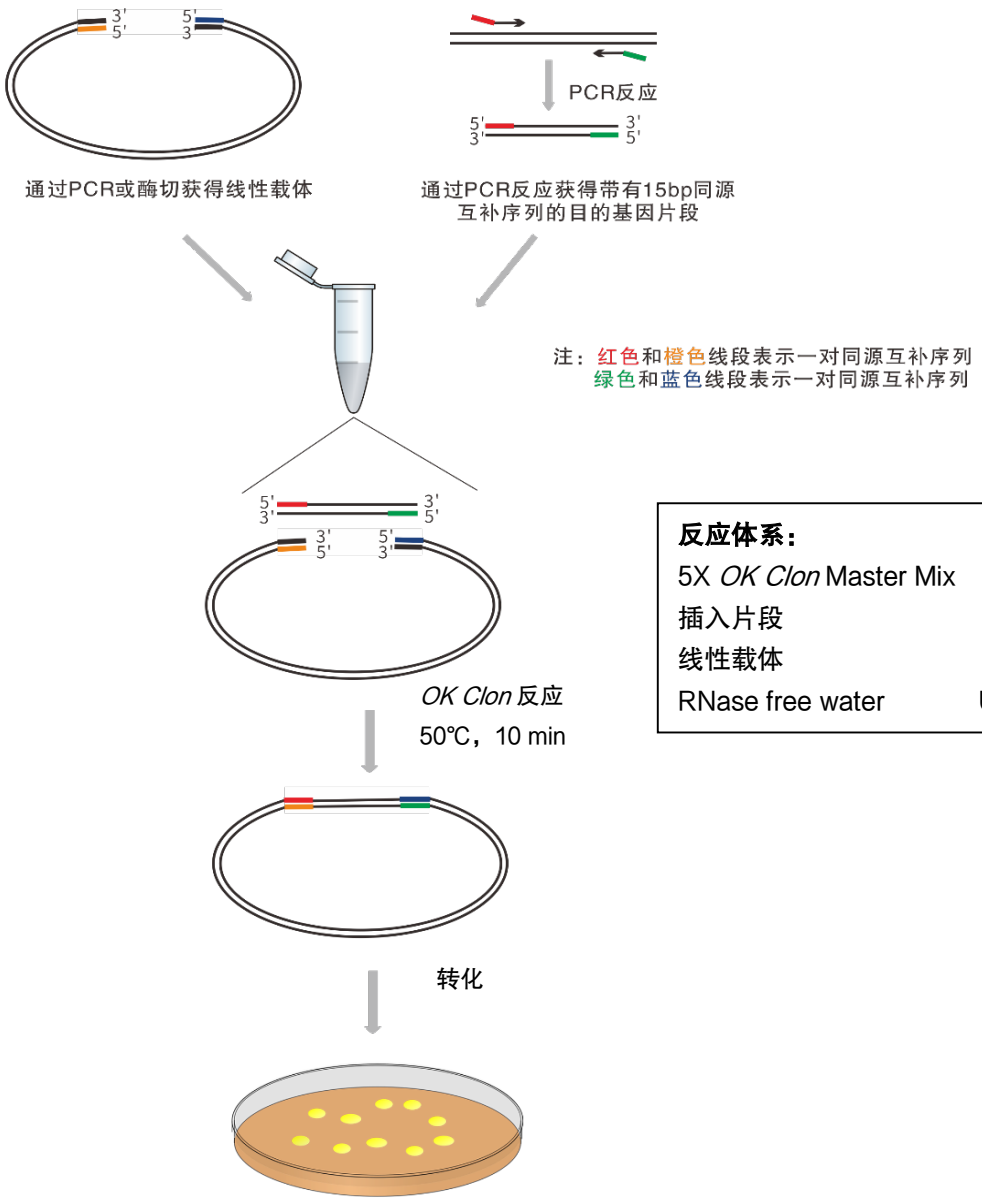
保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或-20℃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℃ 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



反应体系：

5X *OK Clon* Master Mix	2 μl
插入片段	– μl
线性载体	– μl
RNase free water	Up to 10 μl

使用注意事项

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 所有反应混合液需要在冰上配制。

➢ 实验前准备

1. 试剂

目的片段、线性化载体；抗生素；感受态细胞。

2. 仪器：

恒温水浴锅、超净工作台、移液器。

➢ 操作方法

一、 目标 DNA 片段的引物设计

PCR 扩增 DNA 插入片段时，引物设计的合理性会影响克隆反应的成败以及所得到的阳性克隆数量。在引物设计时，除常规要求外，*OK Clon* 反应还需要在引物 5’端加入一段与载体 5’端互补的长度为 15 ~ 20 bp 的接头序列（建议 GC 含量 40% ~ 60%）。*OK Clon* 反应支持多片段连接克隆，但每条片段之间都应有 15 ~ 20 bp 的同源互补序列接头。引物设计可使用本公司官网（www.agbio.com.cn）的 *OK Clon* 引物设计小工具，自动生成插入片段的扩增引物。引物设计原则如下所示：

① 载体末端为平末端时，引物接头的设计：

5’端引物

5’-AAA ACG ACG GCC AGTNNNNNNNNNNNNN…-3’

5’-…CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG GTC ATA GCT GTT TCC TGT…-3’

3’-…GCA ACA TTT TGC TGC CGG TCA TAC CAG TAT CGA CAA AGG ACA…-5’

载体序列 3’-…NNNNNNNNNNNTAC CAG TAT CGA CAA-5’

3’端引物

② 载体末端为平末端时，引物接头的设计（含酶切位点）：

5’端引物 *Sma* I

5’- TCG AGC TCG GTA CCC GGG NNNNNNNNNNNN…-3’

5’-…CCA GTG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC…-3’

3’-…GGT CAC TTA AGC TCG AGC CAT GGG CCC CTA GGA GAT CTC AGC TGG ACG…-5’

载体序列 3’-…NNNNNNNNNNNGGG CCC CTA GGA GAT CTC -5’

Sma I 3’端引物

③ 载体末端为 5’突出时，引物接头的设计（含酶切位点）：

5’端引物 *Hind* III

5’-G CAG GCA TGC AAG CTTNNNNNNNNNNNNN…-3’

5’-…AGA GTC GAC CTG CAG GCA TGC A AG CTT GGC GTA ATC ATG GTC ATA GCT…-3’

3’-…TCT CAG CTG GAC GTC CGT ACG TTC GA A CCG CAT TAG TAC CAG TAT CGA…-5’

载体序列 3’-…NNNNNNNNNNN TTC GAA CCG CAT TAG T-5’

Hind III 3’端引物

④ **载体末端为 3’突出时，引物接头的设计（含酶切位点）：**

5’端引物　　*Kpn* I

5’-GT GAA TTC GAG CTC GGT ACCNNNNNNNNNNNN…-3’

5’-…ACG GCC AGT GAA TTC GAG CTC GGT AC　　C CGG GGA TCC TCT AGA GTC GAC…-3’

3’-…TGC CGG TCA CTT AAG CTC GAG C　　CA TGG GCC CCT AGG AGA TCT CAG CTG…-5’

载体序列　　3’-…NNNNNNNNNNNNCCA TGG GCC CCT AGG AGA TC-5’

Kpn I　　3’端引物

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[*1]（10 μl）

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

*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：

插入片段用量 ng = $A \times \frac{B}{C} \times$ 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 4000 bp 的载体中，载体加入量为 100 ng，则片段的加入量 ng = $2 \times \frac{1000\ bp}{4000\ bp} \times 100$ ng = 50 ng。

*5：若使用本公司产品 Linearized Control Vector & Insert （for *OK Clon*）（Code No.AG11814）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℃	10 min[*2]
冰上 or 4℃[*1]	–

*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 12min；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* HST08 Competent cells（Code No. AG11804）或 *E.coli* DH5α Competent cells（Code No. AG11806）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℃ 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 5μl 连接反应液加入至 100μl 感受态细胞中混匀，冰浴 30 min（注：100μl 感受态细胞不要添加多于 10μl 的反应液，反应液添加过多可能会降低转化效率）；

③ 42℃水浴 45 sec；

④ 水浴加热后迅速置于冰上 2 min；

⑤ 加入 900μl SOC 培养基，37℃ 200 rpm 培养 1 h；

⑥ 取 100μl 菌培养液均匀涂布于带有抗性的固体培养基上，37℃恒温箱倒置培养 ~16 h；

⑦ 阳性克隆筛选。

➢ 实验例

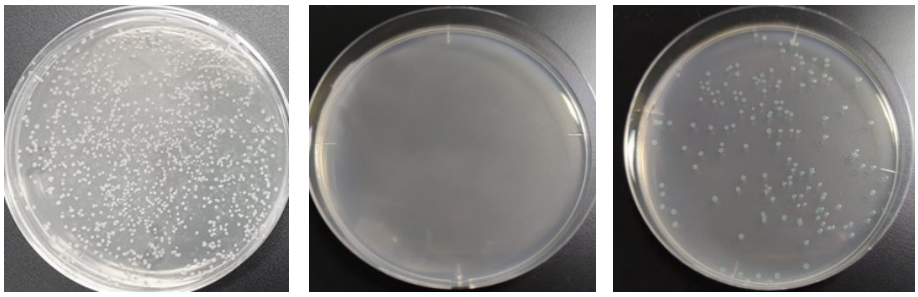
1. 使用本产品搭配 Linearized Control Vector & Insert （for *OK Clon*）（Code No. AG11814）中的线性化载体及片段进行克隆实验：

   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[*1]
5X *OK Clon* Master Mix	2μl	2μl	2μl
Linearized Control vector（50ng/μl）	1μl	1μl	−
2 kb Positive Control Insert（80ng/μl）	1μl	−	−
RNase free water	6μl	7μl	Up to10μl

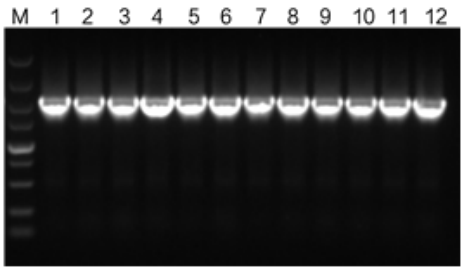
*1：阳性对照仅加入 100 pg 环状的 pUC19 质粒。不加线性化载体与片段。

   2) 将所有组别转化至 *E.coli* DH5α Competent cells（Code No. AG11806），培养的菌悬浮液稀释 2 倍后，100μl 涂布平板（本实验使用 LB 培养基，加入了 Amp 抗生素、IPTD，以及 X-Gal，用于蓝白斑筛选）。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。



实验组　　阴性对照组　　pUC19 阳性对照组

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。



M：*GL* DNA Marker 5000
1~ 12：阳性克隆

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（载载体与插入片段的总体积 ＞8μl），可将 5X *OK Clon* Master Mix 用量加倍，并补加 RNase free water 至总体积为 20μl。
- 转化时，100μl 感受态细胞不要添加多于 10μl 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。