

OK Clon DNA连接试剂盒 II

OK Clon DNA Ligation Kit II

Code No. AG11807

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

产品概述

OK Clon DNA Ligation Kit II 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。本产品是在OK Clon DNA Ligation Kit (Code. AG11802 / AG11803) 的基础上进行了优化，适用范围更广，尤其适合大载体、大片段及多片段的连接。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。

保存

保存温度：-20 $^{\circ}$ C

运输温度：干冰或-20 $^{\circ}$ C冰袋运输

产品组成

2.5X OK Clon Master Mix	40 μ l
Linearized Control vector (50 ng/ μ l)	5 μ l
2 kb Positive Control Insert (80 ng/ μ l)	5 μ l

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. 2.5X 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。

实验操作

反应体系¹ (10 μ l)

组分名称	反应终浓度	加入体积
2.5X OK Clon Master Mix ²	1X	4 μ l
Linearized Vector	50 ng ~ 200 ng ³	- ⁵
Insert DNA fragment	5 ng ~ 200 ng ⁴	- ⁵
RNase free water	-	Up to 10 μ l ⁵

*1: 在配制反应时，先将除2.5X OK Clon Master Mix 以外的组分配制成预混液；然后加入2.5X 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 \geq 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 $\text{ng} = 2 \times \frac{1000 \text{ bp}}{4000 \text{ bp}} \times 100 \text{ ng} = 50 \text{ ng}$ 。

*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 > 6 μl), 可将 2.5X OK Clon Master Mix 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}

温度	时间
50°C	10 min ²
冰上 or 4°C	-

*1: 反应完成后, 反应液可直接用于细菌转化。

*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。

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。】

- 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);
- 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);
- 42°C 水浴 45 sec;
- 水浴后迅速置于冰上 2 min;
- 加入 900 μl SOC 培养基, 37°C 200 rpm 培养 1 h;
- 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;
- 阳性克隆筛选。