

# OK Clon DNA连接试剂盒II

## OK Clon DNA Ligation Kit II

Code No. AG11807

**包装量:** 10 rxns / 10  $\mu$ 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。本产品是在 OK Clon DNA Ligation Kit (Code No. 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 | 40 $\mu$ 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<sup>\*1</sup> (10  $\mu$ l)

| 组分名称                                  | 反应终浓度                        | 加入体积                           |
|---------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 2.5X OK Clon Master Mix <sup>*2</sup> | 1X                           | 4 $\mu$ l                      |
| 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 $\mu$ l <sup>*6</sup> |

\*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<br>(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 4000 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 > 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。

## 反应程序<sup>\*1</sup>

| 温度        | 时间                   |
|-----------|----------------------|
| 50°C      | 10 min <sup>*2</sup> |
| 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*/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°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 LB 固体培养基上, 37°C 恒温箱倒置培养 ~16 h;
7. 阳性克隆筛选。

详细信息请查阅 [www.agbio.com.cn](http://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.