

# OK Clon DNA连接试剂盒 II

## OK Clon DNA Ligation Kit II

Code No. AG11808

<b>包装量:</b>	50 rxns / 10 $\mu$ l
<b>保存温度:</b>	-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	100 $\mu$ l $\times$ 2 pc
Linearized Control vector ( 50 ng/ $\mu$ l )	5 $\mu$ l
2 kb Positive Control Insert ( 80 ng/ $\mu$ l )	5 $\mu$ 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 (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](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.

## 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。】

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。