

Version 2

Code No. AG11811

AG11812

OK Clon DNA 连接试剂盒 III

OK Clon DNA Ligation Kit III

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 连接试剂盒 III 是一种简单、快速、高效的定向无缝克隆试剂盒，可以快速高效地将一段或多段 DNA 片段定向、无缝地克隆到任意载体的任意位置，而不被酶切位点限制。本产品作为新一代无缝克隆试剂盒，适用范围广，可以对不同大小的载体及片段进行连接，可以进行多个片段的无缝克隆，特别适合于多片段的连接。

DNA 连接反应是基于 *OK Clon* Enzyme II 的催化，将含有与载体两末端一致序列（15~20 bp）的片段准确、高效地插入到线性化载体中。只需在设计目的片段 PCR 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 片段进行限制性酶切、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	AG11811 (10 rxns/ 10 μ l)	AG11812 (50 rxns/ 10 μ l)
2.5X <i>OK Clon</i> Master Mix II	40 μ l	100 μ l X 2 pcs

➤ 保存及运输

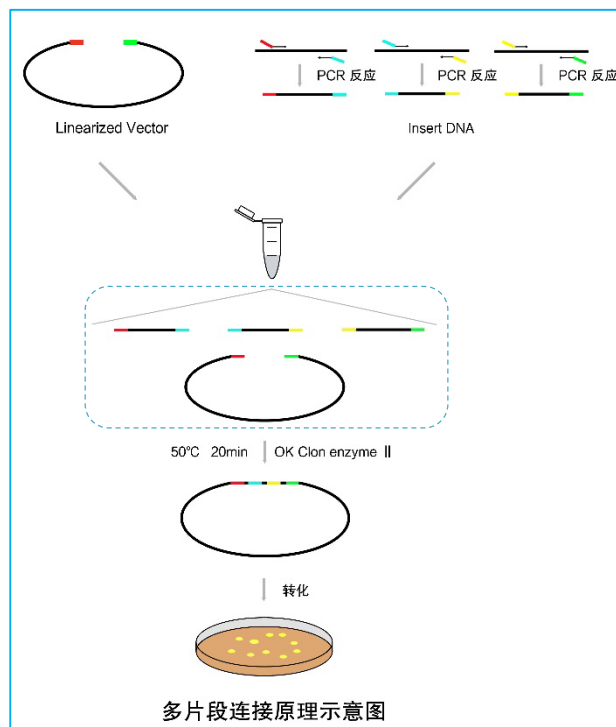
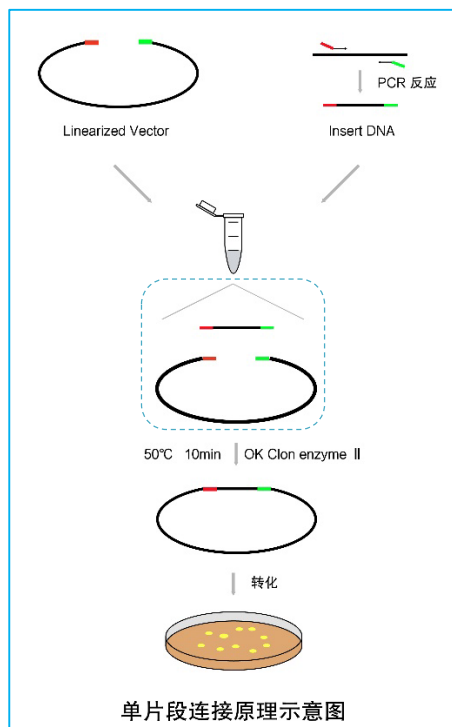
保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或-20℃冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品可将片段插入载体的任意位置，而不受酶切位点限制。
2. 本产品反应效率高，单片段连接反应 10 分钟，多片段连接反应 20 分钟，即可完成连接反应。
3. 适用范围更广，可以对不同大小的载体及片段进行连接，特别适合于多片段的连接。
4. 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用于连接反应。

➤ 实验原理



➤ 使用注意事项

1. 建议线性化载体与插入片段经过纯化后再进行连接反应，高纯度的线性化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需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 II 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、含抗生素的 LB 平板、化学感受态细胞。
2. 仪器：恒温水浴锅、超净工作台、移液器。

➤ 操作方法

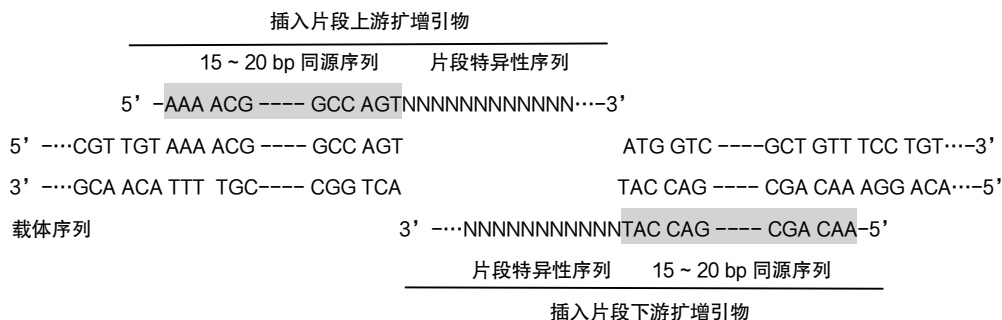
一、目标 DNA 片段的引物设计

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

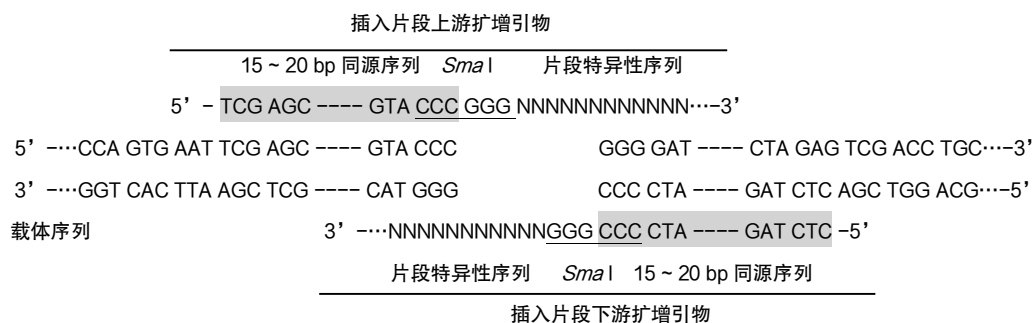
入一段与载体 5' 末端同源互补的长度为 15 ~ 20 bp 的接头序列 (建议 GC 含量 40 ~ 60%) 。

1. 单片段无缝克隆引物设计原则如下所示 (推荐登陆本公司官网 www.agbio.com.cn, 在资源中心中选择实验小工具, 进入单片段克隆界面, 生成插入片段的扩增引物。):

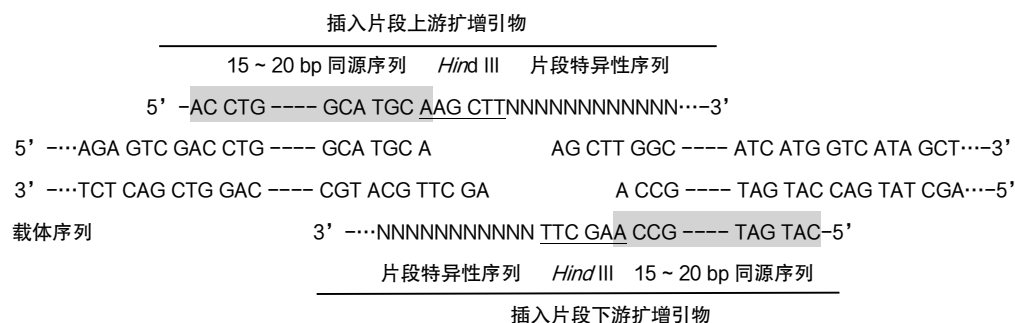
① 载体末端为平末端时, 引物接头的设计:



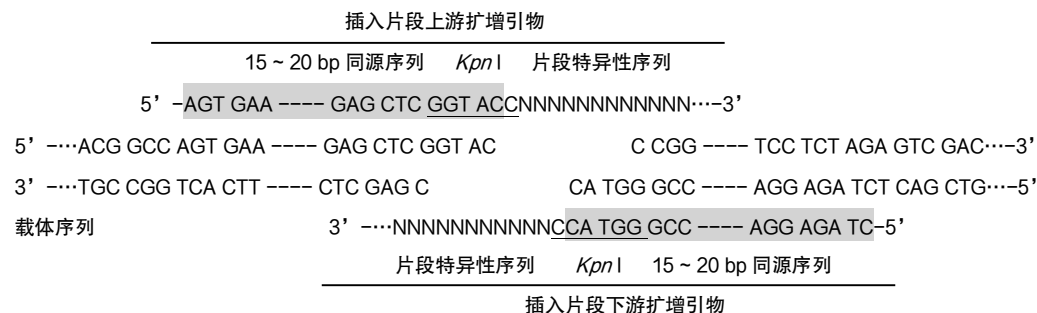
② 载体末端为平末端时, 引物接头的设计 (含酶切位点):



③ 载体末端为 5' 突出时, 引物接头的设计 (含酶切位点):



④ 载体末端为 3' 突出时, 引物接头的设计 (含酶切位点):



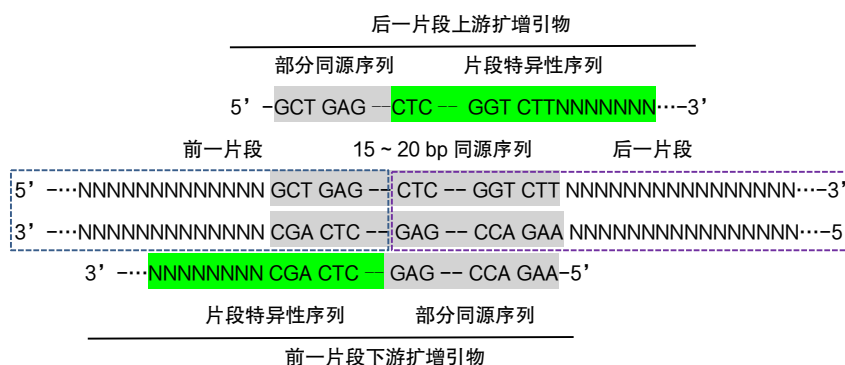
注：引物序列中 N 表示特异性引物序列，即目的片段特异性序列。灰色区域为添加的与载体同源序列接头。

2. 多片段无缝克隆设计原则如下所示（推荐登陆本公司官网 www.agbio.com.cn，在资源中心中选择实验小工具，进入多片段克隆界面，生成插入片段的扩增引物。）：

① 与载体相连接的首尾两个片段的扩增引物的设计原则：可参考单片段无缝克隆引物设计原则。

② 中间各插入片段之间的引物设计方式有以下三种：

- 以前一片段 3' 端 15 ~ 20 bp 作为同源序列添加至后一片段上游引物的 5' 端；
- 以后一片段 5' 端 15 ~ 20 bp 作为同源序列添加至前一片段下游引物的 5' 端；
- 两片段各取一部分作为同源序列(总计 15 ~ 20 bp)，分别添加至前一片段下游引物和后一片段上游引物的 5' 端（如下所示）。



二、 目的片段扩增：

使用任何 PCR 酶（Taq 酶或高保真酶），都可以用于扩增 DNA 片段，但为了最大程度地减少扩增引入的突变风险，建议选择高保真聚合酶进行扩增反应。

产物条带单一时，可使用本公司 PCR 反应液纯化试剂盒（Code No. AG21003）回收和纯化目的片段；产物条带不单一时，建议使用本公司 DNA 凝胶回收试剂盒（Code No. AG21005）回收和纯化目的片段。

目的片段经过纯化后可于-20℃保存备用。

三、 线性化载体的制备：

选择合适的克隆位点，对载体进行线性化。建议优先选择无重复序列且其 GC 含量在 40% ~ 60%之间的位点进行克隆操作，载体线性化方法可参考如下：

1. 限制性内切酶消化：

建议采用双酶切方法以确保载体不会自连，也可以选择单酶切方法。完全线性化的载体是无缝连接成功的关键，在进行限制性内切酶消化时，可适当延长酶切的时间，例如酶切反应过夜，以减少环状质粒的残留，从而降低转化背景。

2. 反向 PCR 扩增：

以原始质粒 DNA 为模板，设计一对反向引物，进行 PCR 可获得大量线性化质粒。建议选用高保真聚合酶以降低扩增引入突变的风险。通常情况下，PCR 反应体系为 50 μl，建议使用 0.1 ~ 1 ng 的原始质粒作为模板，或者采用预先线性化的质粒作为模板。

当以环状质粒为模板进行反向 PCR 扩增制备载体时，推荐 PCR 产物先使用 *Dpn*I 进行消化后再进行纯化回收，以减少环状质粒模板残留对转化子阳性率的影响。

四、连接反应：

1. 可参考下表格计算克隆反应所需的 DNA 量（推荐登陆本公司官网 www.agbio.com.cn，在资源中心中选择实验小工具，进入克隆连接计算界面，计算载体和片段的投入量）：

为了确保加样的准确性，载体和片段的加样量建议不低于 1 μl。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。

	片段长度 < 载体长度	片段长度 ≥ 载体长度
线性化载体投入量	50-200 ng	
单个片段连接 ^{*1, 2}	2 : 1 (若插入片段 < 500 bp, 可在 2 : 1 ~ 5 : 1 范围内进行调整)	1 : 1
多个片段连接 ^{*1, 2}	各片段与载体摩尔比建议 1 : 1 ~ 2 : 1	

*1: 表中的 2 : 1 和 1 : 1 是片段与载体的摩尔比；

*2: 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 1,000 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

$$\text{入量 ng} = 2 \times \frac{1000 \text{ bp}}{4000 \text{ bp}} \times 100 \text{ ng} = 50 \text{ ng}。$$

2. 反应体系配制：

在冰上参考下表格配制反应液^{*1}

组分名称	加入量
2.5X <i>OK Clon</i> Master Mix II ^{*2}	4 μ l
线性化载体	— ^{*3}
n 个插入片段 (n $\leq$ 5)	— ^{*4}
RNase free water	Up to 10 μ l ^{*5}

*1: 配制反应时，先将除 2.5X *OK Clon* Master Mix II 以外的组分配制成预混液，然后加入 2.5X *OK Clon* Master Mix II，为避免枪头中酶液的残留，可轻柔吹打 3 ~ 5 次，最后将配制完成的反应液充分吹打混匀；

*2: 为确保酶液加入量准确，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: 线性化载体的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）。当线性化载体 <10 kb 时，可在 50 ng ~ 100 ng 内调整；当线性化载体 $\geq$ 10 kb 时，可在 50 ng ~ 200 ng 内调整；

*4: 单个片段用量推荐 5 ng ~ 200 ng，但片段的实际加入量需根据插入片段与载体的摩尔比进行添加；

*5: 若载体与插入片段的总体积 > 6 μ l，可将 2.5X *OK Clon* Master Mix II 用量加倍，并补加 RNase free water 至总体积为 20 μ l。

3. 反应^{*1}

连接反应类型	温度	时间
单个片段连接	50°C ^{*4}	10 min ^{*2}
多个片段连接	50°C ^{*4}	20 min ^{*3}

*1: 反应完成后，应降至 4°C 或立即置于冰上冷却。

*2: 单个片段连接推荐反应 10 min，如果连接效率较低，可将反应时间适当延长至 20 min，但最长建议不超过 30 min。

*3: 多个片段连接推荐反应 20 min，如果连接效率较低，可将反应时间适当延长至 40 min，但最长建议不超过 1 h。

*4: 如果连接效率低或者克隆阳性率低，可尝试降低反应温度，温度可在 45°C ~ 50°C 范围内调整。

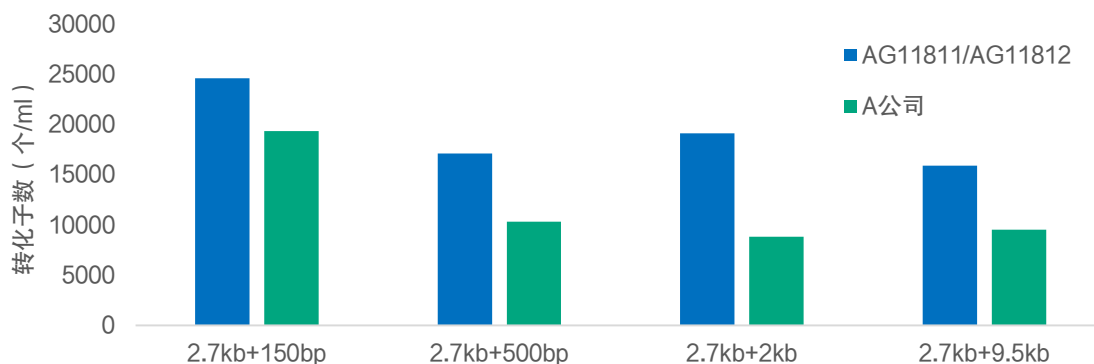
五、转化

【以 *E.coli* HST08 Competent cells (Code No. AG11804) 转化方法为例。某些感受态细胞转化方法可能略有差异，请以相应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 $2.5 \sim 5\ \mu\text{l}$ 连接反应液加入至 $100\ \mu\text{l}$ 感受态细胞中，轻柔混匀，冰浴 $30\ \text{min}$ （注： $100\ \mu\text{l}$ 感受态细胞不要添加超过 $10\ \mu\text{l}$ 的反应液，反应液添加过多可能会降低转化效率）；
3. 42°C 水浴热激 $45\ \text{sec}$ ，热激结束后迅速放于冰上静置 $2\ \text{min}$ ；
4. 加入 $900\ \mu\text{l}$ 无抗 SOC 或 LB 培养基， 37°C $200\ \text{rpm}$ 培养 $1\ \text{h}$ ；
5. 取 $100\ \mu\text{l}$ 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 $\sim 16\ \text{h}$ （注：若菌落数较少，可在涂板前将菌培养液于 $6,000\ \text{rpm}$ 离心 $5\ \text{min}$ ，弃掉 $800\ \mu\text{l}$ 上清，用剩余培养基将菌体重悬，再均匀涂布于带有抗性的 LB 固体培养基上）；
6. 阳性克隆筛选。

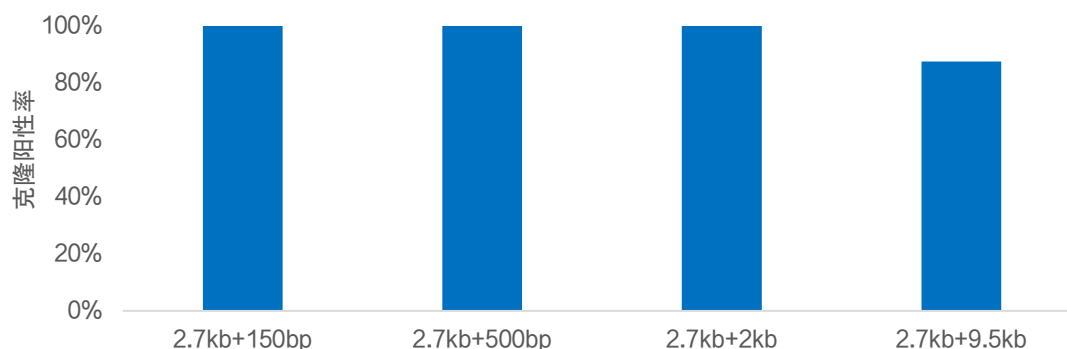
➤ 实验例

1. 以 $2.7\ \text{kb}$ 的线性化载体分别连接 $150\ \text{bp}$ 、 $500\ \text{bp}$ 、 $2\ \text{kb}$ 、 $9.5\ \text{kb}$ 的片段，本产品的转化子数量均多于其他公司同类型产品（如图 1 所示），且克隆的阳性率高达 90% 以上（如图 2 所示）。



注：“+”前面数字表示载体大小；“+”后面数字表示片段大小

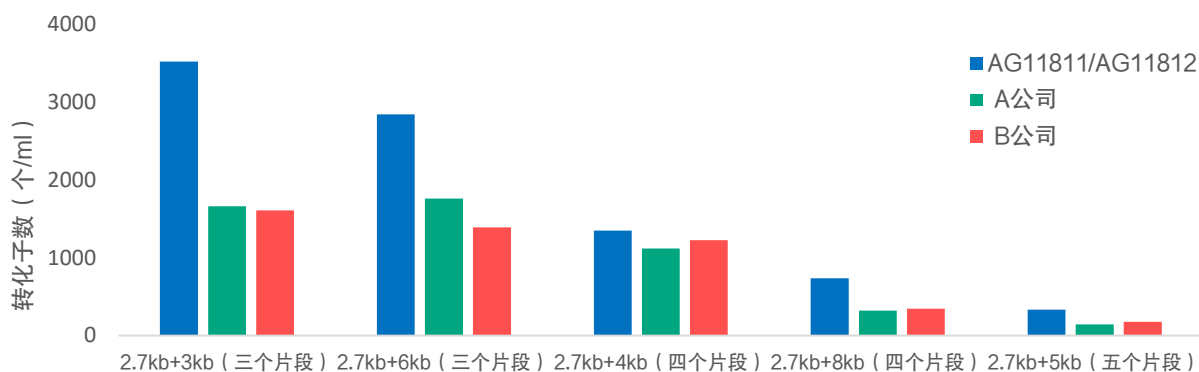
图 1：本产品连接单个片段与同类型产品转化子数比较结果



注：“+”前面数字表示载体大小；“+”后面数字表示片段大小

图 2：本产品连接单个片段的克隆阳性率

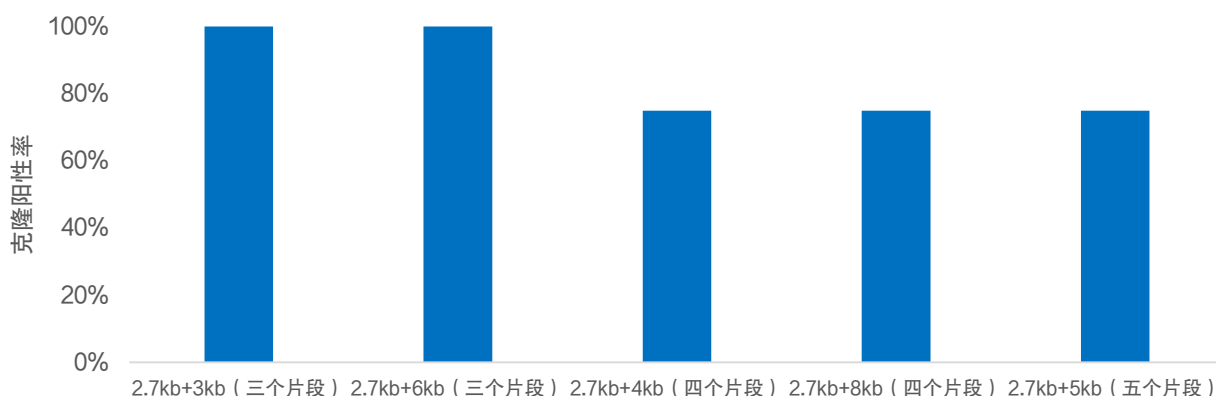
2. 以 2.7 kb 的线性化载体分别连接不同长度的多个片段（3~5 个片段），本产品的转化子数量均多于其他公司同类型产品（如图 3 所示）。且克隆的阳性率高达 75% 以上（如图 4 所示）。



注：“+”前面数字表示载体大小；“+”后面数字表示连接多个片段的总长度；

“()”中表示连接的片段数量。

图 3：本产品连接多个片段与同类型产品转化子数比较结果



注：“+”前面数字表示载体大小；“+”后面数字表示连接多个片段的总长度；

“()”中表示连接的片段数量。

图 4：本产品连接多个片段的克隆阳性率

➤ 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 含量在 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

- ❖ 若载体与插入片段的总体积 > 6 μ l，可将 2.5X *OK Clon* Master Mix II 用量加倍，并补加 RNase free water 至总体积为 20 μ l。
- ❖ 转化时，100 μ l 感受态细胞不要添加超过 10 μ l 的反应液，反应液添加过多可能会抑制转化，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。如果转化子数量较少，可选择转化效率更高的感受态细胞，例如 *E.coli* HST08 感受态细胞 (Code No. AG11804)。
- ❖ 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。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。