

# DNA Ligation Kit

TaKaRa Code : D6020A

包装量 : 150 次量

Shipping at -20°C  
Stored at -20°C

## ●制品说明

DNA 片段的连接是基因操作实验中最频繁的操作，通常使用 T4 DNA Ligase 来进行。该酶因所要连接的 DNA 片段的末端碱基形状的不同，其反应速度有显著的差异。因此，需要通过调节酶量以及多胺、二价金属盐的添加量来达到使连接反应正常进行的目的。

TaKaRa 公司开发的 Ligation Kit 其优点在于省略了上述烦琐的操作。

通常，在进行环状 DNA 的连接时，只需向反应体系中加入一种溶液 ( Solution I )，即可在短时间内完成 DNA 连接，而且连接反应液不必经过 DNA 纯化，可以直接用于细菌转化和体外包装等。

## ●制品内容 (150 次量)

组份名称	包装量
Solution I ( 酶溶液 ) *	5×150 μl

\* 按每次反应使用 5 μl Solution I 计算，可反应 150 次。

## ●使用注意

1. Solution I 因含有 T4 DNA Ligase，使用前请在冰中融化并轻柔混匀，应尽量避免多次反复冻融。
2. DNA 连接液可直接用于琼脂糖凝胶电泳。如要进行聚丙烯酰胺凝胶电泳时，建议使用乙醇沉淀法浓缩 DNA，请不要用苯酚抽提 DNA 连接液。

## ●DNA Ligation Kit 的试剂使用比例

向质粒载体中插入外源 DNA 片段、向质粒载体中插入接头 DNA 以及 DNA 的自身环化反应时，通常按照 DNA Solution 与 Solution I 体积比为 1 : 1 添加。

## ●使用方法及使用例

### A. 向质粒载体中插入 DNA 片段时(操作见图 1) :

使用方法 :

1. 将质粒载体 DNA ( 用适当的限制酶切断，必要时进行去磷酸化处理 ) 与插入 DNA 片段混合制备成体积为 5 ~ 10 μl 的 DNA 溶液 ( TE 溶液或水溶液 )。载体 DNA 和插入 DNA 的摩尔数比一般为 0.03 pmol : 0.1 ~ 0.3 pmol。0.03 pmol 的 pUC18 DNA 大约为 50 ng。
2. 向上述 DNA 溶液中加入等体积 ( 5 ~ 10 μl ) 的 Solution I，充分混匀。
3. 16°C 反应 30 分钟\*1。
4. 反应液可直接用于细菌转化。将 10 ~ 20 μl 的反应液加入到 100 μl 的感受态细胞中\*2。

\*1 反应温度过高 (>26°C) 会抑制 DNA 环化。如果连接效果不佳，可以进行过夜反应。DNA 纯度也影响连接效果 ( 用于连接反应的 DNA 经过苯酚处理/乙醇沉淀将有助于获得理想的结果 )。

\*2 用于转化 100 μl 感受态细胞的最大反应液体积为 20 μl。大于此体积会降低转化效率。另外，连接反应液不适合直接用于电穿孔转化法。此时应先做乙醇沉淀，再用 TE Buffer 或 ddH<sub>2</sub>O 将 DNA 溶解后使用。

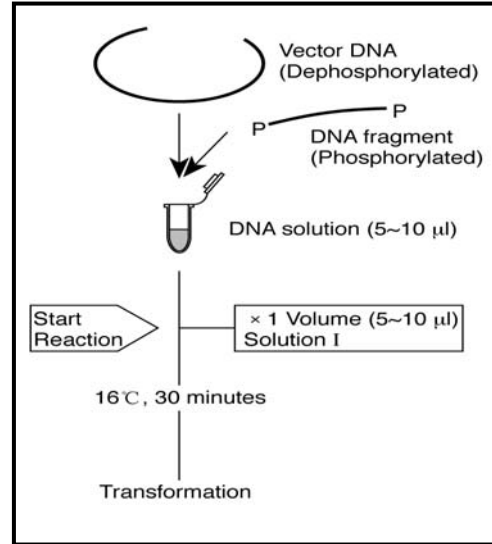


图 1. DNA Ligation Kit 操作示意图

使用例 :

在 pUC118-*EcoR*I DNA ( 50 ng, 25 fmol ) 的溶液中 ( 载体 DNA ) 加入 1.5 kbp 的 *EcoR*I 酶切片段 ( 2.5 ~ 250 ng, 2.5 ~ 250 fmol )，总体积为 5 μl。加入等体积 ( 5 μl ) Solution I，按照标准方法，在 16°C 下反应 30 分钟，然后取 5 μl 连接反应液做细菌转化，在含有 IPTG、X-Gal 的 L-Amp 平板培养基上培养。以白色菌落数计算转化效率，结果如下表所示。同时，用 T4 DNA Ligase ( TaKaRa Code : D2011 ) 350 U 反应 16 小时后，其连接、转化效率与使用本试剂盒的结果做了对比。本实验所用的 *E. coli* JM109 Competent Cell 的转化效率为 6.3×10<sup>7</sup> Colonies/μg pUC118。

表 1. 使用 DNA Ligation Kit 及 T4 DNA Ligase 的连接转化效率比较

摩尔数比	DNA Ligation Kit 反应30分钟		T4 DNA Ligase 反应16小时	
	去磷酸化 载体	非去磷酸化 载体	去磷酸化 载体	非去磷酸化 载体
0.1	1.7×10 <sup>6</sup>	7.8×10 <sup>5</sup>	1.6×10 <sup>5</sup>	4.6×10 <sup>5</sup>
0.3	5.0×10 <sup>6</sup>	2.5×10 <sup>6</sup>	2.0×10 <sup>5</sup>	1.0×10 <sup>6</sup>
1.0	1.7×10 <sup>7</sup>	8.2×10 <sup>6</sup>	1.8×10 <sup>6</sup>	1.9×10 <sup>6</sup>
3.0	2.3×10 <sup>7</sup>	1.7×10 <sup>7</sup>	3.1×10 <sup>6</sup>	5.0×10 <sup>6</sup>
10.0	2.1×10 <sup>7</sup>	2.3×10 <sup>7</sup>	1.9×10 <sup>6</sup>	1.2×10 <sup>7</sup>

\* 载体使用去磷酸化和非去磷酸化两种，表中数字为白色菌落数/μg Insert DNA。

B. 直线 DNA 的自身环化 ( 分子内连接 ) 时 :

TaKaRa 技术服务信息

Tel : 0411-87641685/86, 8008909508  
Fax : 0411-87621675 ;

<http://www.takara.com.cn>

**使用方法：**

直线 DNA 的自身环化反应方法基本上与 A 相同。但是要获得较高的分子内连接和细菌转化效率，反应液中的 DNA 浓度不应太高，DNA 溶液的体积应尽量减小。

**使用例：**

制备 10  $\mu$ l 的 pBR322/*Sca*I DNA ( 350 ng ) 溶液。加入 10  $\mu$ l Solution I，16 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟，反应液用于转化 *E.coli* HB101 Competent cell。结果列于表 2。同时用 T4 DNA Ligase( 350 U，16 $^{\circ}$ C，16 小时 ) 进行了对比实验。

**表 2. DNA Ligation Kit 和 T4 DNA Ligase 的连接转化效率比较**

转化DNA	DNA Ligation Kit ( 30 min. )	T4 DNA Ligase ( 16 hr. )
17 ng	$7.2 \times 10^6$	$5.0 \times 10^5$

\* 表中数字为菌落数/ $\mu$ g DNA。

**●Q&A**

Q1. 连接转化效率低，怎么办？

- A1. ① 延长连接反应时间至过夜。  
② 转化前，向反应液中加入 NaCl 使其终浓度达到 500 mM。加入盐份可提高转化效率。但不适用于电穿孔转化法。  
③ 突出末端连接时，DNA 溶液于 60~65 $^{\circ}$ C 保温 2~3 分钟后再加入 Solution I。  
④ 确认感受态细胞的转化效率。  
当上述四种方法均不能提高连接转化效率时，建议重新纯化 DNA。

Q2. 连接液是否可直接用于电穿孔法转化？

A2. 转化效率会降低。建议先做乙醇沉淀后再做电转化。