

TaKaRa Code: D6024

DNA Ligation Kit LONG

(50 次量)

说明书

TaKaRa

宝生物工程(大连)有限公司

目 录

内 容	页 码
●制品说明	1
●制品内容	1
●保 存	1
●使用方法	1
A.粘性末端连接的使用方法	1
B.平滑末端连接的使用方法	1
●Control 反应的实验例	2
●注意事项	2
●参考文献	4
●关联制品	4

● 制品说明

DNA Ligation Kit LONG 是对长链 DNA 片段进行高效连接的试剂盒。试剂盒中的 DNA Ligase 和连接反应 Buffer 适合于长链 DNA 连接，对 10 kbp 以上的长片段 DNA 连接特别有效。本试剂盒还适用于 BAC Library 等长链 DNA Library 的制作等。

● 制品内容（50 次量）*1

DNA Ligase <LONG>	50 μ l
10 \times LONG Ligation Buffer*2	300 μ l
Control Vector (pUC118/ <i>Hind</i> III/BAP)	10 μ l
Control Insert DNA/ <i>Hind</i> III (18 kbp)	30 μ l
dH ₂ O	1 ml \times 2

*1 本试剂盒对粘性末端的连接为 50 次量，对平滑末端的连接为 10 次量。

*2 10 \times LONG Ligation Buffer 在融解时，如果出现少量沉淀属正常现象，请于 37 $^{\circ}$ C 保温溶解后使用。

● 保存： -20 $^{\circ}$ C。

● 使用方法

A. 粘性末端连接的使用方法

1. 按下列组份配制连接反应混合液。

Vector DNA*1	X μ l (25 ng~50 ng)
Insert DNA*1	X μ l
10 \times LONG Ligation Buffer	5 μ l
dH ₂ O	up to 49 μ l

2. 65 $^{\circ}$ C 保温 3 分钟后，冰中急冷。

3. 加入 DNA Ligase <LONG> 1 μ l，轻微混合。

4. 16 $^{\circ}$ C 保温 3~15 小时。

5. 直接进行转化时，向 100 μ l Competent Cell 中加入 4~10 μ l 上述 4 的连接反应液。需要全量转化时（或需要多于 10 μ l 转化时），需进行 Buffer 置换后再进行转化*2。

*1 Vector DNA 和 Insert DNA 请用 TE Buffer 溶解。进行连接反应时 Vector DNA (2 kbp~10 kbp) 的使用浓度在 0.5 ng~1 ng/ μ l 之间。

Vector DNA/Insert DNA 摩尔比根据 Insert 长度不同而不同，推荐 Vector 与 Insert 等重量(ng) 使用。与普通的短链 DNA (3 kbp 以下) 连接相比，随着 Insert 长度的增长，Vector DNA/Insert DNA 的摩尔比需要增高，推荐摩尔比为：2 : 1~10 : 1。具体请参考“注意事项”的 1 和 3。

*2 请参考“注意事项”的 5 和 6。

B. 平滑末端连接的使用方法

1. 按下列组份配制连接反应混合液。

Vector DNA*1	X μ l (50 ng~100 ng)
Insert DNA*1	X μ l
10 \times LONG Ligation Buffer	5 μ l
dH ₂ O	up to 45 μ l

2. 65 $^{\circ}$ C 保温 3 分钟后，冰中急冷。

3. 加入 DNA Ligase <LONG> 5 μ l，轻微混合。

- 16℃保温 15 小时。
- 直接进行转化时，向 100 μl Competent Cell 中加入 4~10 μl 上述 4 的连接反应液。需要全量转化时（或需要多于 10 μl 转化时），需进行 Buffer 置换后再进行转化*2。

*1 Vector DNA 和 Insert DNA 请用 TE Buffer 溶解。进行连接反应时 Vector DNA (2 kbp~10 kbp) 的使用浓度在 1 ng~2 ng/μl 之间。

Vector DNA/Insert DNA 摩尔比根据 Insert 长度不同而不同，推荐 Vector 与 Insert 等重量(ng) 使用。与普通的 DNA (3 kbp 以下) 连接相比，随着 Insert 长度的增长，Vector DNA/Insert DNA 的摩尔比需要增高，推荐摩尔比为：1 : 2~10 : 1。具体请参考“注意事项”的 1 和 3。

*2 请参考“注意事项”的 5 和 6。

●Control 反应的实验例

- 按下列组份配制连接反应混合液。

Control Vector (pUC118/ <i>Hind</i> III/BAP) (25 ng/μl)	1 μl
Control Insert DNA/ <i>Hind</i> III (18 kbp) (25 ng/μl)	3 μl
10×LONG Ligation Buffer	5 μl
dH ₂ O	up to 49 μl

- 65℃保温 3 分钟后，冰中急冷。
- 加入 DNA Ligase <LONG> 1 μl，轻微混合。
- 16℃保温 3~15 小时。
- 取上述反应液 4 μl 转化至 100 μl Competent Cell 中，涂布于 L-Amp, IPTG, X-Gal Plate，形成菌落。
使用的 *E. coli* Competent Cells (DH5 α , JM109, HST02 等) 转化效率为 1×10⁸ cfu/μg 时，可得到 1×10⁶ cfu/μg Vector DNA 以上的菌落。

●注意事项

- Vector DNA 与长链 Insert DNA 的制备。

Vector DNA 与 Insert DNA 为粘性末端时，连接效率高。平滑末端的连接效率是粘性末端的 1/10~1/100 左右。

由于 DNA 损伤可能会导致连接效率低下，所以在制备 Vector DNA 与 Insert DNA 时，要避免物理损伤，尤其是制备 10 kbp 以上的长链 DNA 时更要特别注意。在凝胶电泳回收片段时，要避免 UV 的长时间照射。

- PCR 产物的克隆。

将长链 PCR 产物克隆时，应先将 PCR 产物末端平滑*后再进行连接，长链 PCR 产物克隆一般不推荐使用 TA 克隆法。

PCR 产物电泳成像时有时尽管只观察到特异性条带，但产物中还是会含有电泳成像时不能分辨到的很多非特异性条带，所以我们推荐使用凝胶电泳切胶回收的方法精制 PCR 产物。

由于 3' Exonuclease 活性作用，使用 Fidelity 高的 Polymerase (如 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase (TaKaRa Code: DR010) 等) 扩增得到的 PCR 产物末端为平滑末端，但其 PCR 产物末端没有磷酸化。进行连接反应前，应使用 T4 Polynucleotide Kinase *进行 5' 末端磷酸化，或者在进行 PCR 反应时，直接使用磷酸化 Primer 进行 PCR 扩增反应。

* PCR 产物末端平滑化、磷酸化相关制品如下：

TaKaRa BKL Kit (TaKaRa Code: D6127)

T4 Polynucleotide Kinase (TaKaRa Code: D2021)

T4 DNA Polymerase (TaKaRa Code: D2040)

3. Vector DNA 与 Insert DNA 摩尔比。

一般短链 DNA (3 kbp 以下) 连接时, Vector DNA/Insert DNA 摩尔比高, 连接效率低; 摩尔比低 (即 Insert DNA 多), 阳性克隆比率高。Vector DNA/Insert DNA 摩尔比对连接效率影响很大, 是一个很重要的因素。根据 DNA 片段的序列不同、末端形状的差异, Vector DNA/Insert DNA 摩尔比也不同, 长片段 DNA 连接时请参考以下条件:

粘性末端

连接反应液中 Vector DNA (2 kbp~10 kbp) 的浓度在 0.5 ng~1 ng/ μ l 时效率最佳, 浓度高时形成的菌落多, 但每微克 Vector DNA 的克隆效率会降低。

Vector DNA/Insert DNA 摩尔比根据 Insert DNA 长度不同而不同, 一般推荐的最适条件为: 2 : 1~10 : 1。

平滑末端

连接反应液中 Vector DNA (2 kbp~10 kbp) 的浓度在 1 ng~2 ng/ μ l 时效率最佳, 浓度高时形成的菌落多, 但每微克 Vector DNA 的克隆效率会降低。

Vector DNA/Insert DNA 摩尔比根据 Insert DNA 长度不同而不同, 一般推荐的最适条件为: 1 : 2~10 : 1。

4. 连接时间。

粘性末端连接请在 16 $^{\circ}$ C 保温 3~15 小时, 平滑末端连接请在 16 $^{\circ}$ C 保温 15 小时。

使用约 18 kbp Insert DNA 进行连接时的时间与效率关系如下图所示。

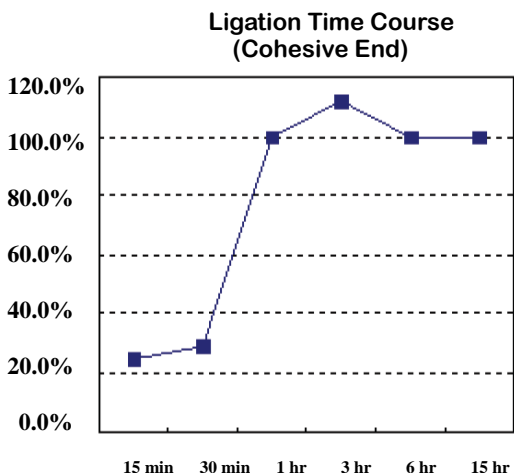


图 1. 粘性末端连接的时间曲线

将 18 kbp Insert DNA/*Hind* III 与 pUC118/*Hind* III/BAP 进行连接, 16 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟~15 小时, 取出一部分连接液进行转化。15 小时反应出现菌落数按 100% 计算, 各个反应时间的菌落比率如左图所示。

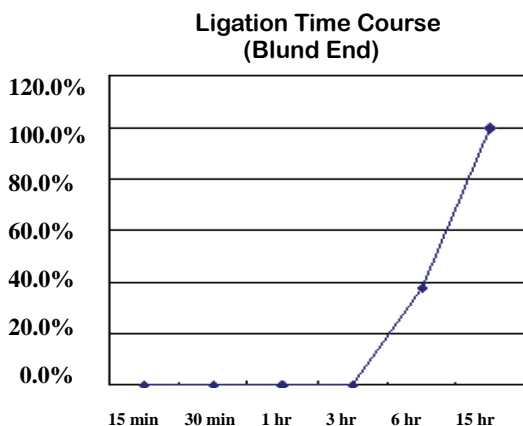


图 2. 平滑末端连接的时间曲线

将 18 kbp Insert DNA/*Sma* I 与 pUC118/*Hinc* II/BAP 进行连接, 16 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟~15 小时, 取出一部分连接液进行转化。15 小时反应出现菌落数按 100% 计算, 各个反应时间的菌落比率如左图所示。

以上结果显示，粘性末端的连接反应 16℃ 3 小时已经充分完成，即使反应 15 小时，效率几乎没有变化；平滑末端连接反应有必要 16℃ 反应 15 小时。

5. 细胞转化。

连接反应液可直接进行转化，转化方法请按照 Competent Cell 使用说明书操作。通常 Chemical Competent Cell 可以转化约至 20 kbp DNA (Vector+Insert)，20 kbp 以上的长链 DNA 连接液转化时推荐使用 Electroporation 法。本实验的连接反应液不能直接进行 Electroporation 法转化，可用乙醇沉淀法或者透析法（参照 6.DropDialysis 法置换 Buffer）等对连接液进行 Buffer 置换。置换 Buffer 请使用灭菌水或者 TE Buffer。要提高转化效率时，推荐使用透析法置换 Buffer。

Bacterial genome 等部分被甲基化的 Genome DNA 克隆时，宿主大肠杆菌由于带有识别甲基化 DNA 序列、并将其识别序列切断的基因 (*mcrA*, *mcrB*, *mcrC*, *hsdRMS*, *mcr*, *mrr*)，易将甲基化的 DNA 切断。特别是长链 DNA，含有甲基化 DNA 比率较高会导致克隆的转化效率下降，目的 DNA 难以克隆。为了避免这种现象，请选用相关基因缺失的大肠杆菌*（如 HST02 等）进行转化。

*甲基化 DNA 克隆、制作文库等，请使用以下制品：

E. coli HST02 Competent Cells (TaKaRa Code: 9127)

E. coli HST02 Electro-Cells (TaKaRa Code: 9026)

HST02 基因型：

F' (*lacIq lacZ* Δ M15 *proAB*) *endA1 gyrA96 thi supE44 relA1 traD36* Δ (*lac-proAB*)
e14 (mcrA) Δ *deoR recA* Δ (*mrr-mcrBC hsdRMS*)

6. DropDialysis 法置换 Buffer。

- (1) 将带盖的玻璃器皿置于冰中，加入 10 倍稀释的 TE Buffer（即 1/10 TE Buffer）25 ml。
- (2) 将 Millipore 0.025 μ M TypeVS membrane 漂浮于 (1) 的 1/10 TE Buffer 上。
- (3) 使用切掉尖端的 Tip 将连接液慢慢轻柔地滴于 (2) 的 TypeVS membrane 上，Buffer 置换 3 小时以上。每隔 30 分钟~1 小时轻柔搅拌 1/10 TE Buffer。
- (4) 使用切掉尖端的 Tip 回收连接液。
- (5) 回收的连接液 1~10 μ l 加入 50 μ l Eletro-Cells 中进行电转化。

●参考文献

Osoegawa, K.*et al.*, (1998) *Genomics* 52, 1.

●关联制品

E. coli HST02 Competent Cells (TaKaRa Code: 9127)

E. coli HST02 Electro-Cells (TaKaRa Code: 9026)

TaKaRa BKL Kit (TaKaRa Code: D6127)

T4 Polynucleotide Kinase (TaKaRa Code: D2021)

MEMO

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
8008909508, 4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: service@takara.com.cn

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.04

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂