

Code No. 6022

研究用

Takara

DNA Ligation Kit Ver.2.1

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 使用注意	1
● 使用方法及示例	2
A. 向质粒载体中插入 DNA 片段	2
B. 线性 DNA 的自身环化（分子内连接）	2
C. 接头（Linker, Adaptor）连接	3
● Q&A	3
● 使用例	4
● 参考文献	7
● 关联产品	8

● 制品说明

本试剂盒是用于快速 DNA 连接反应的简易系统。在本试剂进行连接反应时，只需要加入一种包含 T4 DNA Ligase 和最适 buffer 的酶溶液，终反应液体积小。因为反应高效，大多数连接反应只需 3 分钟，较难的反应也可在 30 分钟内完成。

转化之前在连接混合液中加入 Solution III（转化增强剂）有助于提高转化效率。如果目的 DNA 含量低或预期的连接效率较低，建议使用 Solution III。连接反应液不必经过 DNA 纯化，可直接用于细菌的转化。

试剂使用比例

	Ver.2.1
	试剂使用比例
环状 DNA 连接时： 向质粒载体中插入外源 DNA 片段； 向质粒载体中插入接头 DNA； 自身环化。	DNA solution: 1 Solution I: 1
线型 DNA 连接时： 向 λ-噬菌体载体中插入外源 DNA 片段*； cDNA 与接头（Linker, Adaptor）连接。	DNA solution: 1 Solution II: 1 Solution I: 2

*: 建议使用 TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.1 (Code No. 6021)进行实验。

● 制品内容

Solution I : Enzyme Solution	3 × 250 μl
Solution II : Concatenation Buffer	1 × 750 μl
Solution III: Transformation Enhancer	1 × 200 μl

* 如果每次使用 7.5 μl Solution I，可反应 100 次。

● 保 存

-20°C。Solution III 融化后室温保存，如果产生沉淀，可涡旋数分钟溶解。

● 使用注意

1. 试剂盒中的 Solution I 和 Solution II 建议-20°C保存，反复冻融不会失活。Solution I 因含有 T4 DNA Ligase，使用前请在冰中融化并轻柔混匀。Solution II 可在室温融化并混匀。Solution III 一旦融化，就应于室温保存，若有沉淀，使用前请涡旋溶解。
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。

*乙醇沉淀法：

- 1) 在反应液中加入 1/10 体积的 3 M CH₃COONa(pH5.2)或 1/20 体积的 5 M NaCl 和 2-2.5 倍体积的无水乙醇。
- 2) -20°C静置 20 分钟或-80°C静置 10 分钟。
- 3) 4°C离心收集 DNA。当 DNA 的含量较少时，可加入 carrier 使沉淀效果更好。

● 使用方法及示例

A. 向质粒载体中插入 DNA 片段

使用方法:

1. 将质粒载体 DNA 与插入 DNA 片段混合制备成体积为 5–10 μl 的 DNA 溶液。
建议使用 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 mM EDTA) 溶解 DNA。
载体 DNA 和插入 DNA 的摩尔数比一般为: 0.03 pmol : 0.03–0.3 pmol。(0.03 pmol 的 pUC18 DNA (2.686bp) 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 μl 的反应液加入到 100 μl 的感受态细胞中*2。

*1 连接反应建议在 16°C 进行, 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, 将连接反应的 DNA 用苯酚处理/乙醇沉淀有助于获得理想的结果。当连接 PCR 产物和 T 载体的时候, 时间不要超过一小时, 否则可能出现高本底。

*2 连接液可直接用于转化, 但是在转化之前向 9 μl 的反应液中加入 1 μl 的 Solution III 将会提高转化效率。

另外, 连接反应液不适合直接用于电穿孔法转化。此时应先做乙醇沉淀, 再用 TE Buffer 等低盐缓冲液将 DNA 溶解后使用。Solution III 不能用于电穿孔法转化。

示例:

在 pUC118-*EcoR* I DNA (50 ng, 25 fmol) 的溶液中 (载体 DNA) 加入 1.5 kb 的 *EcoR* I 酶切片段 2.5–250 ng (2.5–250 fmol), 片段与载体比例为 0.1–10.0, 总体积为 5 μl 。加入等体积 (5 μl) Solution I, 在 16°C 下反应 30 分钟, 然后取 5 μl 连接反应液做 *E. coli* JM109 转化, 在含有 IPTG、X-Gal 的 L-Amp 平板培养基上培养 (*E. coli* JM109 感受态细胞有效转化量为 6.3×10^7 cfu/ μg pUC118 DNA)。以白色菌落数计算转化效率, 结果如表 1 所示。同时, 用 T4 DNA Ligase (350 U, 16°C 反应 16 小时), 其连接、转化效率与使用本试剂盒的结果做了对比。

表 1. 转化效率 (每 μg 插入 DNA 对应白色菌落数)

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	1.7×10^6	7.8×10^5	1.6×10^5	4.6×10^5
0.3	5.0×10^6	2.5×10^6	2.0×10^5	1.0×10^6
1.0	1.7×10^7	8.2×10^6	1.8×10^6	1.9×10^6
3.0	2.3×10^7	1.7×10^7	3.1×10^6	5.0×10^6
10.0	2.1×10^7	2.3×10^7	1.9×10^6	1.2×10^7

B. 线性 DNA 自身环化 (分子内连接)

使用方法:

线性 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。

制备 10 μl 的 pBR322-*Sca* I DNA (350 ng) 溶液。加入 10 μl Solution I, 16°C 反应 30 分钟, 取 1 μl 反应液转化 100 μl 的 *E. coli* HB101 (转化效率为 1×10^8 cfu/ μg pBR322 DNA) 感受态细胞, 结果列于表 2。同时与 2.8 Weiss units 的 T4 DNA Ligase 以标准连接体系 16°C 反应 16 小时的结果进行了对比。

表 2. 转化效率 (菌落数/ μg DNA)

转化 DNA	DNA Ligation Kit (30 min.)	T4 DNA Ligase (16 hrs)
17 ng	7.2×10^6	5.0×10^5

C. 接头 (Linker, Adaptor) 连接

使用方法:

1. 向质粒载体中插入 Linker

Linker 连接 (8 个碱基以上) 的反应条件与 A. 相同。但是如果 Linker 短于 8 个碱基, 或是 Linker 结构中 GC 比例较低时, 则在低于 10°C 条件下反应 1-2 小时。

建议 Linker/Vector 摩尔比为: 磷酸化 Linker : 去磷酸化 Vector = 10-100 : 1

磷酸化 Linker : 磷酸化 Vector = 100 以上 : 1

2. 在 DNA 片段的两端连接 Linker (或 Adaptor) (如 Linker 与 cDNA 连接)

1) 准备 5-10 μl DNA 溶液, 其中包含 DNA 片段 (0.01-0.1 pmol) 及 Linker (或 adaptor)。建议 DNA Fragment/Linker (或 adaptor) 的摩尔比为:

DNA Fragment: Linker (或 adaptor) = 1:100 以上

2) 加入等体积 (5-10 μl) Solution II, 混匀。

3) 加入 2 倍体积 (10-20 μl) Solution I, 混匀后 16°C 反应 30 分钟*。

4) 70°C 加热 10 分钟使 T4 DNA Ligase 失活。

5) 如果连接 DNA 用于酶切反应, 则需先做乙醇沉淀, 再用适当的缓冲液重悬 DNA。

*: 如果 Linker 的长度少于 8 个碱基, 或是 Linker 结构中 GC 比例较低时, 则在低于 10°C 条件下反应 1-2 小时。

示例:

在 5 μl 的 DNA 溶液中含有 100 ng 的去磷酸化载体 pUC118-*Hinc* II/BAP (50 fmol) 和 2.6-130 ng (0.5-25 pmol) 的磷酸化 *Bgl* II Linker (5' -CAGATCTG-3'), 加入 5 μl 的 Solution I 后, 16°C 反应 30 分钟。其中一部分直接用于转化 *E.coli* JM109 (转化效率为 1.5×10^8 Colonies/ μg pUC118 DNA) 感受态细胞并在含有 IPTG、X-Gal、Amp 的 L-平板培养基上培养。菌落计数并计算转化效率, 结果见表 3, 同时与 350 U 的 T4 DNA Ligase 以标准连接体系 16°C 反应 16 小时的结果进行对比。

表 3. 转化效率 (白色菌落数/ μg pUC118 DNA)

	Linker/Vector (摩尔比)			
	10	50	100	500
DNA Ligation Kit 30 min	2.0×10^6	8.0×10^6	3.0×10^7	2.5×10^7
T4 DNA Ligase 16 hr	1.2×10^6	3.2×10^6	2.3×10^6	2.4×10^6

● 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 9 μl 连接液中加入 1 μl Solution III 可提高转化效率。

3) 粘性末端 DNA 连接时, 将 DNA 溶液 (载体+片段) 于 $60-65^\circ\text{C}$ 保温 2-3 分钟后急冷, 再加入 Solution I 进行反应。

当上述三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。Solution III 不能用于电穿孔法转化。
- Q3. 连接反应中使用粘粒可以吗?
A3. 可以。反应方法与 A 相同。若进行体外包装, 建议使用 DNA Ligation Kit Ver.1 (Code No. 6021)。
- Q4. 使用本试剂盒进行连接反应时, 可以直接取酶切反应液作为 DNA 溶液吗?
A4. 建议先将酶切反应液做乙醇沉淀处理, 再重悬于适宜的缓冲液中, 然后使用本试剂盒做连接反应。同样, 如果在连接后做酶切反应, 也需要先将反应液做乙醇沉淀处理, 再重悬于适宜的缓冲液中, 然后进行酶切反应。
- Q5. 乙醇沉淀处理前可以在连接反应液中加入 NaCl 等盐溶液吗?
A5. 可以。直接向连接反应液中加入盐溶液 (终浓度为 150 mM NaCl, 2 M CH₃COONH₄ 或 300 mM CH₃COONa), 再进行乙醇沉淀处理。
- Q6. DNA Blunting Kit (Code No. 6025)的溶液 A 和溶液 B 适用于 DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Code No. 6022)吗?
A6. 不适用。DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Code No. 6022)适用于等体积 Solution I 和 DNA 溶液混合的小体系连接反应。如果在使用 DNA Blunting Kit 之后使用 DNA Ligation Kit Ver.2.1, 则需将 DNA 溶液先进行苯酚处理, 再做乙醇沉淀后使用。
- Q7. 切胶回收的 DNA 片段连接效率如何?
A7. 如果 DNA 片段是使用商品化的提取产品或试剂 (如柱子或硅胶) 回收的, 那么使用本试剂盒进行连接反应, 效率可能会降低。这时, 可以将回收的 DNA 片段做乙醇沉淀处理, 再重悬于适宜的缓冲液 (如 TE) 中再进行连接反应。

● 使用例

1. 三分钟连接反应

对于一般的环状 DNA 连接反应, 25°C 反应 3 分钟或 16°C 反应 30 分钟效果相同。以下结果证明: 使用 DNA Ligation Kit Ver.2.1 做 3 分钟连接与常规方法进行连接反应效果相同。

[1-1]线性 DNA 自身环化反应 (粘性末端和平末端的连接)

分别制备 200 ng (10 μl) 的 pUC118-*EcoR* I DNA 和 pUC118-*Hinc* II DNA。用 DNA Ligation Kit Ver.2.1 进行连接操作, 25°C 反应 3 分钟或 16°C 反应 30 分钟。取 1.6 μl (16 ng) 连接反应液转化 *E. coli* JM109 感受态细胞 (1.3×10^8 transformants/μg pUC118 DNA), 结果如表 4 所示。

表 4. 环化反应的连接效率

末端类型	25°C 连接 3 分钟	16°C 连接 30 分钟
粘性末端 (<i>EcoR</i> I)	7.4×10^7	6.1×10^7
平末端 (<i>Hinc</i> II)	1.3×10^7	3.1×10^7

[1-2]接头连接

将 100 ng 的 pUC118-*Hinc* II 用碱性磷酸酶去磷酸化处理, 使用本试剂盒将其与 260 ng 的 pBg/II linker pd[CAGAATCTG] 连接, 25°C 反应 3 分钟或 16°C 反应 30 分钟。取部分反应液转化 *E. coli* JM109 感受态细胞 (1.3×10^8 transformants/μg pUC118 DNA), 结果如表 5 所示。

表 5. 接头连接的连接效率

25°C连接 3 分钟	16°C连接 30 分钟
8.9×10^6	9.1×10^6

2. Solution III 的作用 (转化增效剂)

[2-1]粘性末端载体连接

将 pUC118/*Hind* III BAP(Code No. 3324)(50 ng, 25 fmol)与 564 bp 的 λ DNA-*Hind* III 片段(0.25 - 75 fmol)或 2,027 bp 的 λ DNA-*Hind* III 片段(6.25 - 75 fmol)混合。向 5 μ l DNA 溶液中加入 5 μ l Solution I, 16°C反应 30 分钟。取 10 μ l 或 9 μ l 的反应液加入 1 μ l Solution III, 然后转化 *E. coli* JM109 感受态细胞 (1.5×10^8 transformants/ μ g pUC118 DNA)。在含有 X-Gal 和 IPTG 的 L-amp 平板培养基上培养, 结果如图 1-1 所示。

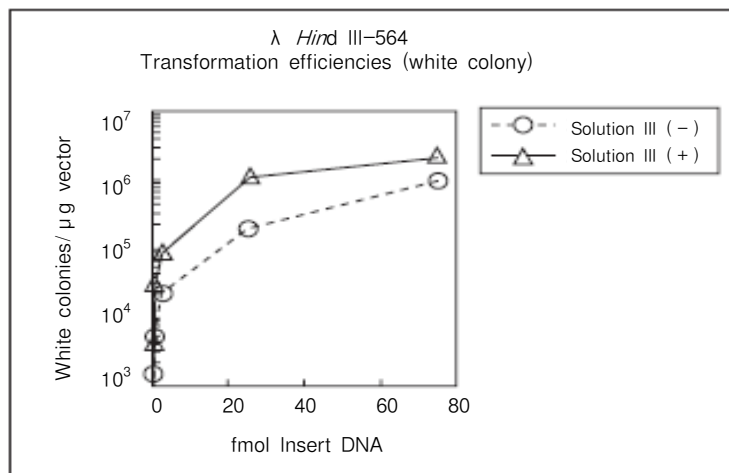
[2-2]平末端载体连接

将 pUC118/*Hinc* II BAP(Code No. 3322)(50 ng, 25 fmol)与 500 bp 的 λ DNA-*Hinc* II 片段(0.25 - 75 fmol)或 2,080 bp 的 λ DNA-*Hinc* II 片段(2.5 - 75 fmol)混合。向 5 μ l DNA 溶液中加入 5 μ l Solution I, 16°C反应 30 分钟。取 10 μ l 或 9 μ l 的反应液加入 1 μ l Solution III, 然后转化 *E. coli* JM109 感受态细胞 (1.2×10^8 transformants / μ g pUC118 DNA)。在含有 X-Gal 和 IPTG 的 L-amp 平板培养基上培养, 结果如图 1-2 所示。

图 1-1 转化效率 (粘性末端连接反应)

插入: λ -*Hind* III 片段(564 bp)

插入 DNA (fmol)	插入片段/载体 (摩尔比)	转化效率 (白色菌落数/ μ g 载体)		白色菌落数/总菌落数 (%)	
		Solution III(-)	Solution III(+)	Solution III(-)	Solution III(+)
0	-	1.6×10^3	4.4×10^3	9.9	7.9
0.25	1/100	5.2×10^3	3.1×10^4	41.9	29.8
2.5	1/10	2.3×10^4	8.8×10^4	79.0	75.2
25	1	2.0×10^5	1.0×10^6	98.1	98.7
75	3	9.5×10^5	2.0×10^6	99.2	99.1



插入: λ -Hind III 片段(2,027 bp)

插入 DNA (fmol)	插入片段/载体 (摩尔比)	转化效率 (白色菌落数/ μ g 载体)		白色菌落数/总菌落数 (%)	
		Solution III(-)	Solution III(+)	Solution III(-)	Solution III(+)
0	-	1.8×10^3	2.4×10^3	12.7	12.6
6.25	1/4	9.4×10^3	2.3×10^4	38.8	41.1
12.5	1/2	1.5×10^4	3.8×10^4	56.0	46.0
25	1	2.3×10^4	2.6×10^4	69.9	70.0
75	3	4.6×10^4	1.3×10^5	75.8	74.0

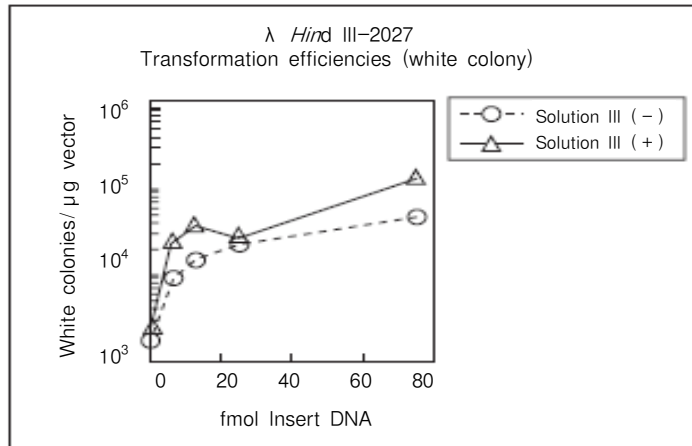
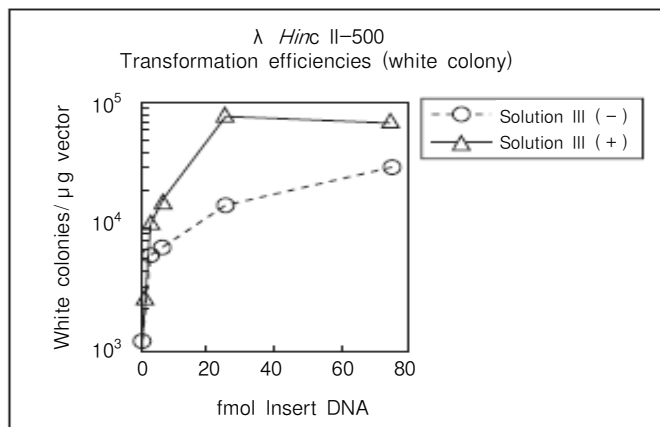


图 1-2 转化效率 (平末端连接反应)

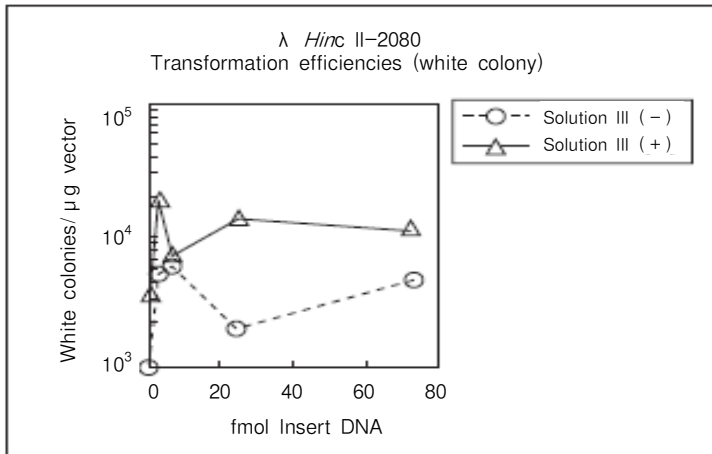
插入: λ -Hinc II 片段(500 bp)

插入 DNA (fmol)	插入片段/载体 (摩尔比)	转化效率 (白色菌落数/ μ g 载体)		白色菌落数/总菌落数 (%)	
		Solution III(-)	Solution III(+)	Solution III(-)	Solution III(+)
0	-	1.2×10^3	2.7×10^3	8.7	8.8
0.25	1/10	6.0×10^3	1.1×10^4	23.3	16.5
6.25	1/4	6.8×10^3	1.6×10^4	38.2	32.3
25	1	1.5×10^4	7.8×10^4	78.9	72.2
75	3	3.0×10^4	6.9×10^4	75.0	84.9



插入: λ -*Hinc* II 片段(2,080 bp)

插入 DNA (fmol)	插入片段/载体 (摩尔比)	转化效率 (白色菌落数/ μ g 载体)		白色菌落数/总菌落数 (%)	
		Solution III(-)	Solution III(+)	Solution III(-)	Solution III(+)
0	-	1.0×10^3	3.6×10^3	6.4	6.3
6.25	1/4	5.2×10^3	1.8×10^4	17.9	14.2
12.5	1/2	6.0×10^3	6.7×10^3	22.7	20.1
25	1	2.0×10^3	1.4×10^4	33.3	36.5
75	3	4.6×10^3	1.1×10^4	31.9	38.5



从[2-1]和[2-2]每个反应中挑取 8 个单菌落, 通过菌落直接 PCR 来验证外源片段的插入。

表 6

插入 DNA	插入 DNA (fmol)	插入片段/载体 (摩尔比)	含插入 DNA 的白色菌落数/挑取白色菌落数 Solution III (+)
pUC118/ <i>Hind</i> III BAP	-	-	0/8
λ - <i>Hind</i> III 片段(564 bp)	0.25	1/100	8/8
λ - <i>Hind</i> III 片段 (2,027bp)	6.25	1/4	7/8
pUC118/ <i>Hinc</i> II BAP	-	-	0/8
λ - <i>Hinc</i> II 片段(500 bp)	2.5	1/10	6/8
λ - <i>Hinc</i> II 片段(2,080 bp)	6.25	1/4	5/8

如图 1-1,1-2 所示, 在连接反应液中添加 1/10 体积的 Solution III (转化增效剂) 有助于转化效率的提高。总之, 插入片段量越少, 得到的阳性菌落越少。如果插入 DNA 含量低或者连接效率较低 (比如插入 DNA 为大片段或平末端), 则最好在转化之前向连接反应液中加入 Solution III。

● 参考文献

Hayashi, K, Nakazawa, M., Ishizaki, Y., Hiraoka, N. and Obayashi, A. (1986) *Nucleic Acids Res.*, **14**, 7617-7631.

● 关联产品

DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Code No. 6023)

DNA Ligation Kit Ver.1 (Code No. 6021)

DNA Ligation Kit LONG (Code No. 6024)

T4 DNA Ligase (Code No. 2011A/B)

pUC118 *Hinc* II/BAP (Code No. 3322)

pUC118 *Eco*R I/BAP (Code No. 3320)

pUC118 *Bam*H I/BAP (Code No. 3321)

pUC118 *Pst* I/BAP (Code No. 3323)

pUC118 *Hind* III/BAP (Code No. 3324)

PrimeGel™ Agarose LE 1–20K GAT (Code No. 5801A)

E. coli HST08 Premium Competent Cells (Code No. 9128)

E. coli HB101 Competent Cells (Code No. 9051)

E. coli JM109 Competent Cells (Code No. 9052)

PrimeGel is a trademark of Takara Bio Inc.

注意

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。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考Takara Bio Inc.网站。为正确使用Takara产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>