

Code No. 6023Q

研究用

Takara

DNA Ligation Kit

<Mighty Mix>

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 使用方法及使用例	2
● 稳定性	8
● Q&A	9
● 使用注意事项	9
● 参考文献	9
● 相关产品	10

● 制品说明

DNA 片段连接反应频繁用于基因工程实验操作中。DNA 的连接通常使用 T4 DNA Ligase，但 DNA 片段的末端形状对 T4 DNA Ligase 连接反应速度影响很大。因此，根据 DNA 片段末端形状需要调整酶的添加量和反应时间。本公司研发的 DNA Ligation Kit，不需要调整酶添加量和反应时间，可简便、快速地进行 DNA 连接反应。

DNA Ligation Kit<Mighty Mix>是以往 DNA Ligation Kit 的升级产品，连接效率高。本制品具有以下特点：

◎ 预混型

是酶和 Buffer 的预混型试剂，只需在 DNA 中加入 Ligation Mix 溶液即可高效完成连接反应，操作简便。本制品反复冻融后，反应性能仍然稳定。

◎ 也适用于平滑末端和 TA 克隆

不仅适用于粘性末端连接，也可以高效地进行平滑末端的 DNA 连接和 TA 克隆。

◎ 连接反应仅需 5 分钟

25°C 反应 5 分钟即可完成插入片段与质粒载体的连接，节省实验时间。

DNA Ligation Kit<Mighty Mix>的反应液量和反应条件

	DNA 溶液：Ligation Mix (体积比)	反应条件
[1] 质粒载体中插入外源 DNA 片段 [标准操作流程] [快速操作流程]	1:1	16°C, 30 分钟 25°C, 5 分钟
[2] PCR 产物的 T 载体克隆	1:1	16°C, 30 分钟
[3] 线性 DNA 的分子内连接 (自身环化)	1:1	16°C, 30 分钟
[4] Linker Ligation, Adaptor Ligation 质粒载体中插入 linker DNA cDNA 与接头 (Linker、Adaptor) 连接	1:1 1:2	16°C, 30 分钟
[5] λ 噬菌体中插入外源 DNA 片段 (体外包装)	1:2	26°C, 10 分钟

* 说明书提供的实验结果是使用 DNA Ligation Kit<Mighty Mix>获得的实验数据。

● 制品内容

Ligation Mix 150 μl

按每次使用量为 7.5 μl，可反应 20 次。

● 保 存

-20°C

使用前在冰上融化 (5~10 分钟)，吸打混匀。已证实反复冻融 50 次对反应性能没有影响。

● 使用方法及使用例

【1】向质粒载体中插入外源 DNA 片段

一般的连接反应请参考[标准操作流程]进行连接。粘性末端或平滑末端的连接对连接效率要求不高时，使用[快速操作流程]也可获得很好的连接效率（连接效率的结果比较请参考使用例 4）。想缩短反应时间时，请尝试[快速操作流程]。

[标准操作流程]

- (1) 将 pUC118 DNA (3,162 bp) (50 ng, 25 fmol) 质粒载体和插入 DNA 片段 (25~250 fmol) 混合配制成体积为 5~10 μ l 的 DNA 溶液*¹。
- (2) 向上述 DNA 溶液中加入等体积 (5~10 μ l) 的 Ligation Mix, 充分混合。
- (3) 16°C 反应 30 分钟*²。
- (4) 反应液直接用于转化时, 将 10 μ l*³ 反应液加入到 100 μ l Competent cells 中。
 - * 1: 使用 TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) 溶解 DNA。
 - * 2: 插入 DNA 片段和质粒载体的连接效果不好时, 可以延长反应时间至过夜。
 - * 3: 直接进行热转化时, DNA 连接液不要超过 10 μ l。当使用大量的 DNA 连接液进行热转化或使用电穿孔法转化时, 请先进行乙醇沉淀纯化 DNA。

[快速操作流程]

- (1) 将 pUC118 DNA (3,162 bp) (50 ng, 25 fmol) 质粒载体和插入 DNA 片段 (25~250 fmol) 混合配制成体积为 5~10 μ l 的 DNA 溶液*¹
- (2) 向上述 DNA 溶液中加入等体积 (5~10 μ l) 的 Ligation Mix, 充分混合。
- (3) 25°C*³ 反应 5 分钟。
- (4) 反应液直接用于转化时, 将 10 μ l*² 反应液加入到 100 μ l Competent cells 中。
 - * 1: 使用 TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) 溶解 DNA。
 - * 2: 直接进行热转化时, DNA 连接液不要超过 10 μ l。当使用大量的 DNA 连接液进行热转化或使用电穿孔法转化时, 请先进行乙醇沉淀纯化 DNA。
 - * 3: 提高反应温度 (>26°C) 则难以形成环状 DNA。使用快速操作流程时务必在 25°C 进行连接反应。

<使用例>

使用例 1: 粘性末端载体的连接

方法: 配制含有 pUC118 *Hind* III/BAP (Code No. 3324) (50 ng, 25 fmol) 和插入片段大小为 564 bp 的 λ DNA/*Hind* III (2.5~150 fmol) 的 DNA 混合溶液 7.5 μ l, 再加入 7.5 μ l Ligation Mix, 16°C 反应 30 分钟。取 10 μ l 连接反应液加入到 100 μ l *E. coli* JM109 Competent cells (7.3×10^8 cfu/ μ g pUC118) 中转化, 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板上培养, 形成单菌落, 菌落计数并计算转化效率。

结果:

插入片段/载体 (摩尔比)	转化效率 (菌落数/ μ g 载体)		白色菌落/总菌落 (%)
	白色菌落	蓝色菌落	
-	3.8×10^4	2.5×10^5	13.0
1/10	5.6×10^5	2.4×10^5	70.2
1/4	1.1×10^6	2.4×10^5	82.9
1	4.3×10^6	2.4×10^5	92.6
3	8.2×10^6	3.3×10^5	96.2
6	9.1×10^6	2.4×10^5	97.4

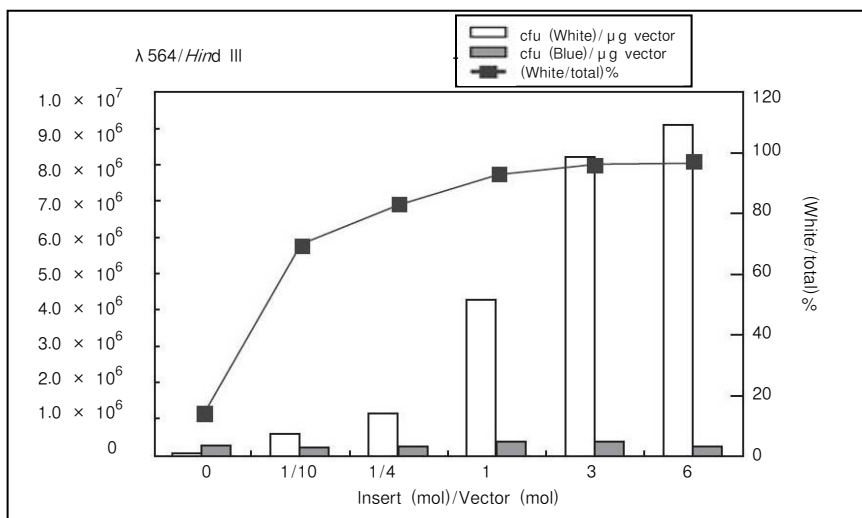


Figure 1. λ-Hind III 片段 (564 bp) 的载体连接

使用例 2: 平滑末端载体的连接

方法: 配制含有 pUC118 *Hinc* II/BAP (Code No. 3322) (50 ng, 25 fmol) 和插入片段大小为 500 bp 的 λ DNA/*Hinc* II (2.5~150 fmol) 的 DNA 混合溶液 7.5 µl, 再加入 7.5 µl Ligation Mix, 16°C 反应 30 分钟。取 10 µl 连接反应液加入到 100 µl *E. coli* JM109 Competent cells (7.3 × 10⁹ cfu/µg pUC118) 中转化, 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板上培养, 形成单菌落, 菌落计数并计算转化效率。

结果:

插入片段/载体 (摩尔比)	转化效率 (菌落数/µg 载体)		白色菌落/总菌落 (%)
	白色菌落	蓝色菌落	
—	1.6 × 10 ⁴	2.1 × 10 ⁵	6.7
1/10	5.6 × 10 ⁵	2.3 × 10 ⁵	70.6
1/4	1.1 × 10 ⁶	2.2 × 10 ⁵	83.0
1	4.2 × 10 ⁶	3.0 × 10 ⁵	93.4
3	7.5 × 10 ⁶	2.6 × 10 ⁵	96.7
6	6.7 × 10 ⁶	3.7 × 10 ⁵	94.8

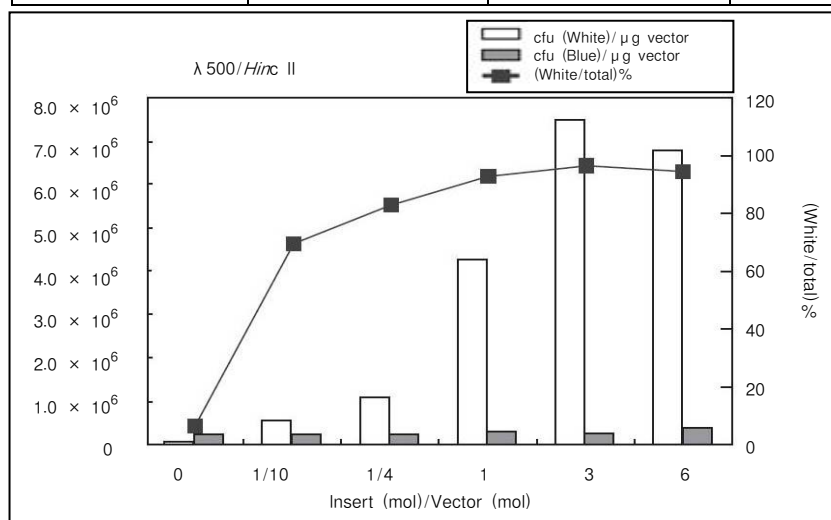


Figure 2. λ-Hinc II 片段 (500 bp) 的载体连接

表 1 确认载体的插入片段（正确的插入片段/白色菌落）

Insert	Insert: Vector	
	0.1: 1	3: 1
λ 564/ <i>Hind</i> III	21/24	24/24
λ 500/ <i>Hinc</i> III	24/24	22/24

Insert / Vector 摩尔比大于 1 时，可获得连接转化效率很高的阳性菌落。

Insert / Vector 摩尔比大于 6 时，有时会降低连接转化效率。

建议使用 Insert / Vector 的摩尔比为 3 的连接反应。Insert DNA 长度过短形成 Multi-ligation（数个 Insert DNA 串联后插入到载体中）的频率就高。Insert / Vector 的摩尔比越高，形成 Multi-ligation 的频率就越高。出现 Multi-ligation 频率高时，请降低 Insert / Vector 的摩尔比。

使用例 3-1: 5' 末端磷酸化载体与 5' 末端去磷酸化插入 DNA 片段的连接

方法：配制含有 *Hinc* II 酶切的 pUC118 载体（50 ng, 25 fmol, 5' 末端磷酸化）和 500 bp 的 5' 末端去磷酸化 *Hinc* II 酶切片段（25~750 fmol）的 DNA 混合溶液 7.5 μ l，再加入 7.5 μ l Ligation Mix，16 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。取 10 μ l 连接反应液加入到 100 μ l *E. coli* JM109 Competent cells (6.2×10^8 cfu/ μ g pUC118) 中转化，在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板上培养，形成单菌落，菌落计数并计算转化效率。

结果：

插入片段/载体 (摩尔比)	转化效率 (菌落数/ μ g 载体)		白色菌落/总菌落 (%)
	白色菌落	蓝色菌落	
0	1.1×10^6	8.0×10^7	1.3
1	3.6×10^6	6.4×10^7	5.3
5	6.7×10^6	5.0×10^7	11.9
15	5.0×10^6	2.6×10^7	16.3
30	3.6×10^6	1.5×10^7	19.1

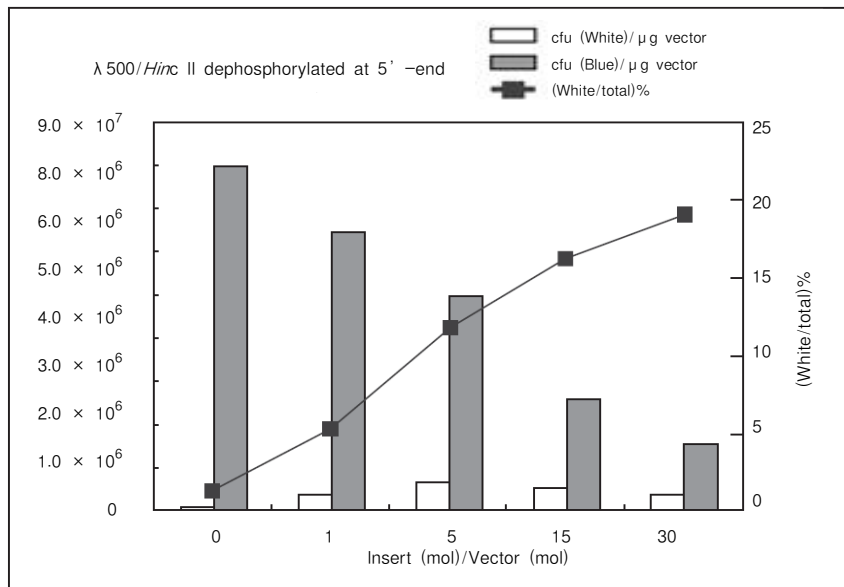


Figure 3-1.

使用例 3-2: 5' 末端磷酸化载体与 5' 末端磷酸化插入 DNA 片段的连接

方法: 配制含有 *Hinc* II 酶切的 pUC118 载体 (50 ng, 25 fmol, 5' 末端磷酸化) 和 500 bp 的 5' 末端磷酸化 *Hinc* II 酶切片段 (25~750 fmol) 的 DNA 混合溶液 7.5 μ l, 再加入 7.5 μ l Ligation Mix, 16 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。取 10 μ l 连接反应液加入到 100 μ l *E. coli* JM109 Competent cells (4.6×10^8 cfu/ μ g pUC118) 中转化, 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板上培养, 形成单菌落, 菌落计数并计算转化效率。

结果:

插入片段/载体 (摩尔比)	转化效率 (菌落数/ μ g 载体)		白色菌落/总菌落 (%)
	白色菌落	蓝色菌落	
0	2.7×10^5	5.6×10^7	0.5
1	3.0×10^6	5.6×10^7	5.1
5	8.1×10^6	4.4×10^7	15.5
15	6.0×10^6	1.9×10^7	24.3
30	3.5×10^6	8.9×10^6	28.4

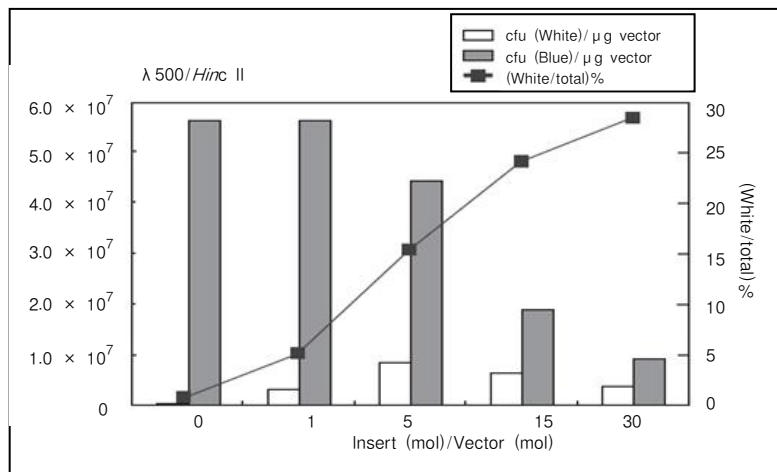


Figure 3-2.

载体的 5' 末端不需要去磷酸化处理也可获得阳性克隆。Insert/Vector 的摩尔比越大, 获得的阳性菌落越多。5' 末端磷酸化载体也可用于 5' 末端去磷酸化 DNA 片段的插入。

使用例 4: 快速操作流程 (25 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟)

方法: 分别使用粘性末端载体和平滑末端载体进行 25 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟和 16 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟的连接反应, 并对二者的连接转化效率进行了比较。同时与 D 公司的试剂盒以推荐条件 25 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟的结果进行了比较。

结果:

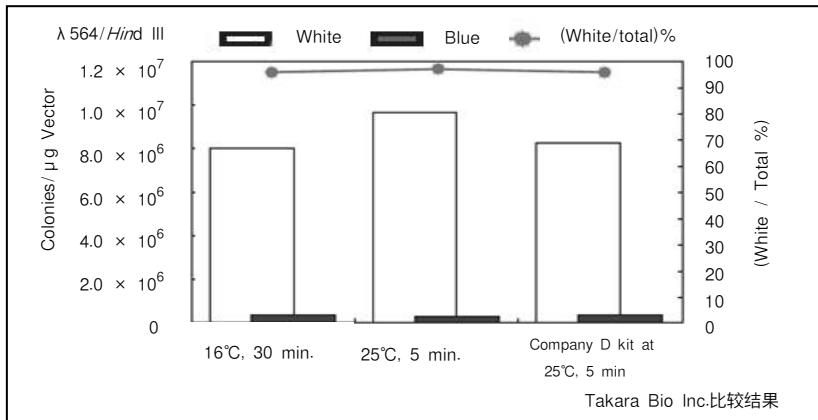


Figure 4-1.

粘性末端载体连接

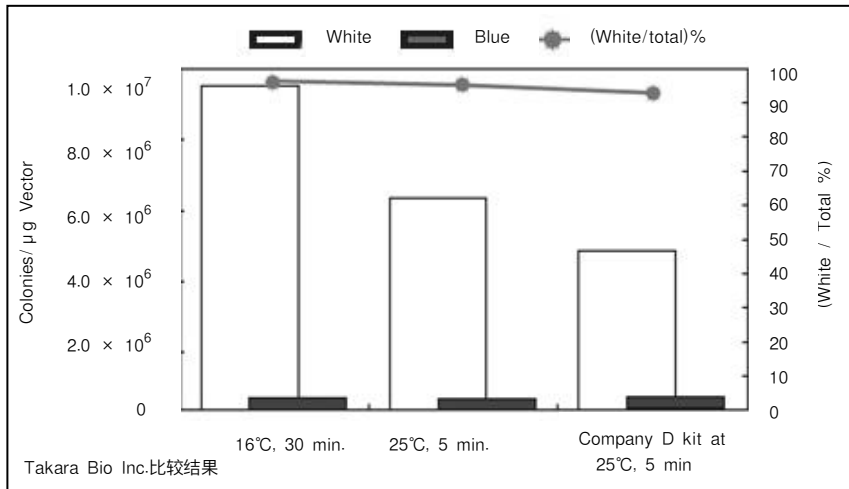


Figure 4-2. 平滑末端载体的连接

粘性末端载体在 25°C 反应 5 分钟和 16°C 反应 30 分钟的连接转化效率相同。平滑末端载体在 16°C 反应 30 分钟的连接转化效率较高，25°C 反应 5 分钟的连接转化效率高于 D 公司。

因此，粘性末端载体的连接及无连接转化效率要求的平滑末端载体连接可大大缩短反应时间。

【2】PCR 产物的 T 载体克隆

- (1) 将 25~50 ng 的 T 载体 (13~25 fmol) 和插入 DNA 片段 (25~250 fmol) 混合配制成为积为 5~10 µl 的 DNA 溶液*¹
- (2) 向上述 DNA 溶液中加入等体积 (5~10 µl) 的 Ligation Mix，充分混合。
- (3) 16°C 反应 30 分钟*²。
- (4) 反应液直接用于转化时，将 10 µl*³ 反应液加入到 100 µl Competent cells 中。

*1: 使用 TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) 溶解 DNA。

*2: 使用 T 载体进行 PCR 产物的连接时，反应时间不要超过 1 小时。

*3: 直接进行热转化时，DNA 连接液不要超过 10 µl。当使用大量的 DNA 连接液进行热转化或使用电穿孔法转化时，请先进行乙醇沉淀纯化 DNA。

<使用例> T 载体的连接

方法: 配制含有 pT7Blue T-Vector (25 ng, 13 fmol) 和插入片段为 2,080 bp 的 PCR 片段 (39 fmol) 的 DNA 混合溶液 10 µl，再加入 10 µl Ligation Mix，16°C 反应 30 分钟。取 10 µl 连接反应液加入到 100 µl *E. coli* JM109 Competent cells (7.8 × 10⁸ cfu/µg pUC118) 中转化，在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板上培养，形成单菌落，菌落计数并计算转化效率。

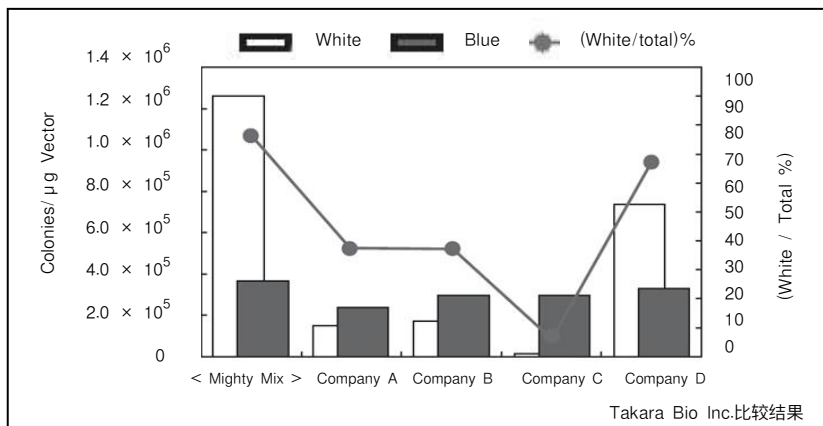


Figure 5.

使用本试剂盒进行 PCR 产物的 T 载体克隆时获得的阳性克隆效率要高于其他公司产品。

【3】线性 DNA 分子内的连接（自身环化）

使用方法：同【1】向质粒载体中插入外源 DNA 片段。

<使用例> pUC118 *Hinc* II 片段的自身环化

方法：经限制酶 *Hinc* II 酶切后 pUC118 DNA 片段（250 ng，5' 末端磷酸化）按照操作流程 16°C 反应 30 分钟。然后取一部分连接反应液加入到 100 μ l *E. coli* JM109 Competent cells (1.1×10^9 cfu/ μ g pUC118) 中转化。

结果：

DNA 量	转化效率 (cfu/ μ g vector)
17 ng	1.2×10^7

【4】接头 (Linker, Adaptor) 连接、

1. 向质粒载体中插入接头：

插入方法同【1】向质粒载体中插入外源 DNA 片段。

建议 Linker/Vector 摩尔比为：

- 磷酸化 Linker : 去磷酸化 Vector = 10~1,000 : 1
- 磷酸化 Linker : 磷酸化 Vector = >100 : 1

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

(1) 准备 5~10 μ l 含有 DNA 片段和 Linker (或 Adaptor) 的 DNA 溶液。建议 DNA 片段和 Linker 的摩尔比如下：

DNA 片段 (10~100 fmol): Linker = 1 : >100

(2) 在上述 DNA 溶液中加入 2 倍体积 (10~20 μ l) 的 Ligation Mix, 混匀后 16°C 反应 30 分钟。*1

(3) DNA 连接液如果需要进行酶切反应时, 请先乙醇沉淀纯化 DNA, 将回收 DNA 用适当的缓冲液溶解。

*1: Linker 结构不稳定 (富含 AT 序列、Linker 长度少于 8 个碱基) 时, 则在低于 10°C 条件下反应 1~2 小时。

<使用例> 质粒载体中插入 Linker

方法：配制含有去磷酸化载体 pUC118 *Hinc* II/BAP (50 ng, 25 fmol) (Code No. 3322) 和 pBgl II Linker—dp(CAGATCTG) (130 ng, 25 pmol) 的混合 DNA 溶液 10 μ l。

按照操作流程, 16°C 反应 30 分钟。然后取一部分连接反应液加入到 100 μ l *E. coli* JM109 Competent cells (8.4×10^8 cfu/ μ g pUC118) 中转化, 在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 L-琼脂平板上培养, 形成单菌落, 菌落计数并计算转化效率。

结果：

Linker/Vector 摩尔比	转化效率 (cfu/ μ g vector)
0	5.3×10^5
1,000	4.5×10^7

【5】 λ 噬菌体载体中插入外源 DNA 片段

(1) 将 250 ng λ 噬菌体载体 (10 fmol) 和插入 DNA 片段 (30~100 fmol) 混合配制成 DNA 溶液。

(2) 在上述 DNA 溶液中加入 2 倍体积 (5~10 μ l) 的 Ligation Mix, 充分混合。

(3) 26°C 反应 5~10 分钟。*1

(4) λ 噬菌体的体外包装。*2

*1: 反应温度在 26°C 时的连接效率比 16°C 要高。延长反应时间会使连接效率下降。因此, 控制反应时间为 5~10 分钟。

* 2: DNA Ligation Kit 溶液可直接用于 λ 噬菌体的体外包装。使用 Packaging Kit [MaxPlax Lambda Packaging Extracts (EPICENTRE Technologies)、GigaPack (Agilent Technologies)]时, 用于体外包装的 DNA Ligation Kit 使用量与 packaging lysate 的体积比在 10%以下时, DNA Ligation Kit 溶液不会抑制噬菌体的包装。一般情况下, 进行一次体外包装时, DNA Ligation Kit 溶液的最大使用量为 4 μ l。如果需要将 DNA 连接液全量进行体外包装时, 需要将 DNA 乙醇沉淀后, 使用 TE Buffer 溶解 DNA (TE Buffer 使用量为 packaging lysate 的 10%以下)。

使用 DNA Ligation Kit <Mighty Mix> 进行体外包装时的注意事项

使用 DNA Ligation Kit <Mighty Mix>的体外包装效率和使用 DNA Ligation Kit Ver. 1 进行体外包装的效率相当。使用 DNA Ligation Kit <Mighty Mix>时, 反应液的体积是 DNA 溶液的 3 倍, 而使用 DNA Ligation Kit Ver. 1 时是 DNA 溶液的 2 倍。因用于体外包装的反应液添加量受限制*2, 当 DNA Ligation Kit 直接用于体外包装时, 建议使用 DNA Ligation Kit Ver. 1, 可使用多量的 DNA 进行体外包装。

< 使用例> λ 噬菌体的体外包装

方法: 在 1 μ g *Eco*R I、*Sal* I 酶切处理后的 Uni-ZAP XR vector (1 μ l) (Agilent Technologies) 中加入 *Eco*R I、*Sal* I 酶切处理后的 400 ng pBR322 DNA (3.3 μ l) 后, 按照标准操作流程, 将 10 μ l 反应液 26°C反应 10 分钟。然后取其中的 2.5 μ l 连接反应液与 GigaPack III Gold 和 MaxPlax Lambda Packaging Extracts 进行体外包装, 形成噬菌斑。

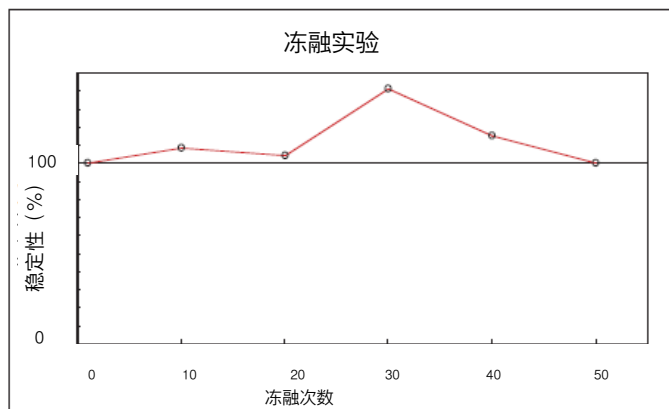
结果:

	体外包装试剂	噬菌斑数/ μ g Uni-ZAP XR vector
DNA Ligation Kit <Mighty Mix>	GigaPack III	2.6×10^6
	MaxPlax	5.5×10^6
DNA Ligation Kit Ver. 1	GigaPack III	6.0×10^6
	MaxPlax	9.2×10^6

● 稳定性

本产品反复冻融后, 使用 pUC118 *Hind* III/BAP vector 和 564 bp 的 *Hind* III 片段进行连接反应后确认其连接效率。

反复冻融 50 次, 结果显示连接效率没有下降。



● 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) 平滑末端载体的连接反应时, DNA 溶液的盐浓度过高, 会降低连接转化效率。平滑末端载体连接时, 尽量将 DNA 溶液中的盐除去。

3) 粘性末端的 DNA 连接反应时, 将 DNA 溶液(载体+插入 DNA 片段)于 60~65°C 保温 2~3 分钟后急冷, 再加入 Ligation Mix 后进行连接反应。确保粘性末端的 DNA 连接可改善转化效率。

Q2. 连接反应液是否可直接用于电穿孔法转化?

A2. 转化效率会降低, 不可直接用于电穿孔法转化。建议乙醇沉淀置换 Buffer 后再进行电穿孔法转化。

Q3. Cosmid 的连接反应如何做?

A3. Cosmid 用于感受态细胞转化时, 请按照「1. 向质粒载体中插入外源 DNA」的方法进行操作。

Cosmid 用于体外包装时, 请按照「5. 向 λ Phage Vector 中插入外源 DNA」的方法进行操作。

Q4. 酶切反应液可直接用于 Ligation Kit 吗?

A4. 建议先将酶切反应液进行乙醇沉淀处理, 再溶解于 TE Buffer 中。如果在连接后做酶切反应, 也将反应液做乙醇处理后再进行酶切反应。

Q5. 乙醇沉淀处理前可以在 DNA Ligation Kit 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(NaCl 终浓度 150 mM, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 终浓度 2 M, CH_3COONa 终浓度 300 mM) 后再进行乙醇沉淀处理。

Q6. DNA Ligation Kit <Mighty Mix>可替代 DNA Blunting Kit (Code No. 6025) 中的 Ligation Solution A 和 Ligation Solution B 吗?

A6. 不可以。DNA Blunting Kit (Code No. 6025) 中的 Ligation Solution A 和 Ligation Solution B 与 DNA Ligation Kit Ver. 1 的组份相同。DNA Ligation Kit <Mighty Mix>比 DNA Ligation Kit Ver. 1 更适用于等体积的 DNA 溶液和 Ligation Mix 混合的小体系连接反应。由于连接反应易受 DNA 溶液组成的影响, 所以使用 DNA Ligation Kit <Mighty Mix> 替代 DNA Blunting Kit 中的 Ligation Solution A 和 Ligation Solution B 会导致连接反应失败。使用 DNA Ligation Kit <Mighty Mix> 时, 需将 DNA 溶液先进行苯酚处理、乙醇沉淀后再使用。

Q7. 切胶回收的 DNA 片段连接效率低, 怎么办?

A7. 如果使用商品化的 DNA 提取试剂盒, 从柱子或硅胶回收的 DNA 提取液直接进行连接反应时, 连接效率可能会降低。这时, 可以将 DNA 提取液进行乙醇沉淀, 溶解于 TE Buffer 后再进行连接反应。

● 使用注意事项

(1) DNA Ligation 是 -20°C 保存的冷冻品, 反复冻融不会失活。

使用前在冰上融化, 吸打混合。

(2) 使用本试剂盒获得的 DNA 连接反应液, 可直接用于琼脂糖凝胶电泳。如果进行聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 建议乙醇沉淀后再进行电泳。

(3) DNA 连接反应液直接进行苯酚抽提时, 反应液会出现白色浑浊。

(4) DNA 连接反应后进行乙醇沉淀处理时, 向反应液中加入 1/10 体积的 3 M CH_3COONa (pH5.2) 或 1/20 体积的 5 M NaCl, 和 2~2.5 倍体积的无水乙醇, -20°C 静置 20 分钟或 -80°C 静置 10 分钟后, 4°C 离心回收 DNA。DNA 含量较少时, 加入 Carrier 使沉淀效果更好。

● 参考文献

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

● 相关产品

T4 DNA Ligase (Code No. 2011A/B)
DNA Ligation Kit Ver.1 (Code No. 6021)
TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (Code No. 6024)
pUC118 *Hinc* II/BAP (Code No. 3322)
pUC118 *Eco*R I/BAP (Code No. 3320)
pUC118 *Bam*HI 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)

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>