

Code No. 6024

研究用

TaKaRa

TaKaRa DNA Ligation Kit LONG

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	1
● 注意事项	2
● 参考文献	4
● 关联产品	4

● 制品说明

TaKaRa DNA Ligation Kit LONG 是对长链 DNA 片段进行高效连接的试剂盒，对 10 kb 以上的长片段 DNA 连接特别有效，特别适用于 BAC Library 的构建。本试剂盒适用于以下实验：

- 1) 插入长片段 DNA 的载体构建。
- 2) BAC Library 的构建。
- 3) 长链cDNA的克隆。

转化实验推荐使用Stellar™ Competent Cells (Code No. 636763/636766) 和Stellar Electrocompetent Cells (Code No. 636765)，这些感受态细胞对于构建插入长片段DNA或cDNA的克隆有优势。

● 制品内容 (50 次量*)

DNA Ligase <LONG>	50 μl
10×LONG Ligation Buffer	300 μl
Control Insert DNA/ <i>Hind</i> III (18 kb)	30 μl
Control Vector (pUC118/ <i>Hind</i> III/BAP)	10 μl
dH ₂ O	1 ml×2

* 本试剂盒对粘性末端的连接反应为 50 次量，对平末端的连接反应为 10 次量，反应体积均为 50 μl。

● 保存： -20°C。

● 使用方法

A. 粘性末端载体连接的使用方法

1. 室温下，在微量离心管或 PCR tube 管中配制如下反应混合液。

Vector DNA* ¹	X μl (25–50 ng)
Insert DNA* ¹	Y μl
10×LONG Ligation Buffer	5 μl
dH ₂ O	Z μl
<hr/>	
	49 μl

2. 65°C保温 3 分钟后，冰中急冷。
3. 加入 DNA Ligase <LONG>1 μl，冰上操作。
4. 16°C保温 3–15 小时。
5. 直接进行转化时，向 100 μl *E.coli* 感受态细胞中加入 4–10 μl 上述 4 的连接反应液。如果需要全量转化而体积多于 10 μl 时，在转化前需要进行乙醇沉淀再重悬于适宜的缓冲液中*²。

*¹ Vector DNA 和 Insert DNA 请用 TE Buffer 溶解。

反应中推荐的 Vector DNA (2–10 kb) 浓度为 0.5–1.0 ng/μl。Vector DNA: Insert DNA 的 1:1 比例可能会提供成功的结果。但是，如果存在效率问题，请尝试 Vector DNA: Insert DNA = 2:1–10:1 的摩尔比进行反应。

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. 室温下，在微量离心管或 PCR tube 管中配制如下反应混合液。

Vector DNA*1	X μ l (50–100 ng)
Insert DNA*1	Y μ l
10×LONG Ligation Buffer	5 μ l
dH ₂ O	Z μ l
<hr/>	
	45 μ l

2. 65°C保温 3 分钟后，冰中急冷。
3. 加入 DNA Ligase <LONG> 5 μ l，冰上操作。
4. 16°C保温 15 小时。
5. 直接进行转化时，向 100 μ l *E.coli* 感受态细胞中加入 4–10 μ l 上述 4 的连接反应液。如果需要全量转化而体积多于 10 μ l 时，在转化前需要进行乙醇沉淀再重悬于适宜的缓冲液中*2。

*1 Vector DNA 和 Insert DNA 请用 TE Buffer 溶解。

反应中推荐的 Vector DNA (2–10 kb) 浓度为 1–2 ng/ μ l。Vector DNA: Insert DNA 的 1: 1 比例可能会提供成功的结果。但是，如果存在效率问题，请尝试 Vector DNA: Insert DNA = 1: 2–10: 1 的摩尔比进行反应。

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。

C. Control 反应

1. 室温下，在微量离心管或 PCR tube 管中配制如下反应混合液。

Control Vector (pUC118/ <i>Hind</i> III/BAP) (25 ng/ μ l)	1 μ l
Control Insert DNA/ <i>Hind</i> III (18 kb) (25 ng/ μ l)	3 μ l
10×LONG Ligation Buffer	5 μ l
dH ₂ O	40 μ l
<hr/>	
	49 μ l

2. 65°C保温 3 分钟后，冰中急冷 3 分钟。
3. 加入 DNA Ligase <LONG> 1 μ l。
4. 16°C保温 3–15 小时。
5. 取上述反应液 4 μ l 转化至 100 μ l *E.coli* 感受态细胞中，涂布于 LB–Amp, IPTG, X–Gal 平板，形成菌落。使用的 *E.coli* 感受态细胞 (Stellar, DH5 α , JM109, HST02) 转化效率为 1×10^8 cfu/ μ g 时，可得到 1×10^6 以上的白色菌落。

● 注意事项

1. Vector DNA 与长链 Insert DNA 的制备。
 - 1) 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，要尽量减少 UV 的照射时间。
 - 2) 若想实现高效克隆，尽量使用粘性末端进行连接，它比平滑末端的连接效率高 10–100 倍。
2. PCR 产物的克隆。
 - 1) 含有 3' A 末端的长链 PCR 产物克隆时，一般不推荐使用 TA 克隆法。如果需要克隆此类 PCR 产物，先使用 T4 DNA Polymerase 将片段的末端平滑化，再与平末端的载体连接。
 - 2) 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纯化 PCR 产物。

3) 由于具有 3' → 5' 核酸外切酶活性, 使用高保真的 DNA Polymerase (如 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 等) 扩增得到的 PCR 产物末端为没有磷酸化的平滑末端。所以在进行连接反应前, 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。

3. Vector DNA 与 Insert DNA 摩尔比。

当 Vector DNA/Insert DNA 摩尔比低于 1:1 时, 连接效率将会降低; 另一方面, 当 Insert DNA 量高时, 阳性克隆比率高。Vector DNA/Insert DNA 摩尔比和浓度对连接效率影响很大, 是很重要的因素。高浓度的载体 DNA 能够提高重组子总数, 但克隆效率会降低。

粘性末端

连接反应液中 Vector DNA (2 kb–10 kb) 的浓度在 0.5 ng–1 ng/μl 时效率理想, 适宜的 Vector DNA/Insert DNA 摩尔比为 2:1–10:1。

平滑末端

连接反应液中 Vector DNA (2 kb–10 kb) 的浓度在 1 ng–2 ng/μl 时效率理想, 适宜的 Vector DNA/Insert DNA 摩尔比为 1:2–10:1。

4. 连接时间。

粘性末端连接请在 16°C 保温 3–15 小时 (图 1); 平滑末端连接缓慢, 请在 16°C 保温至少 15 小时 (图 2)。

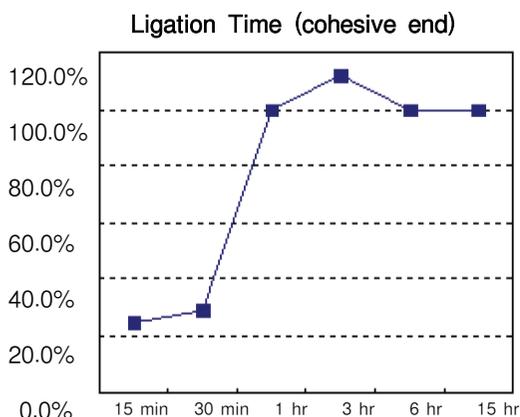


图 1. 粘性末端连接的时间曲线

将 18 kb Insert DNA/*Hind* III 与 pUC118/*Hind* III/BAP 按标准方法进行连接, 连接产物化学转化感受态细胞, 在 LB-amp 平板 37°C 培养过夜。计数平板上的菌落数, 每个时间点的菌落数比率如图显示, 以 15 小时出现的菌落数比率为 100% 计算。

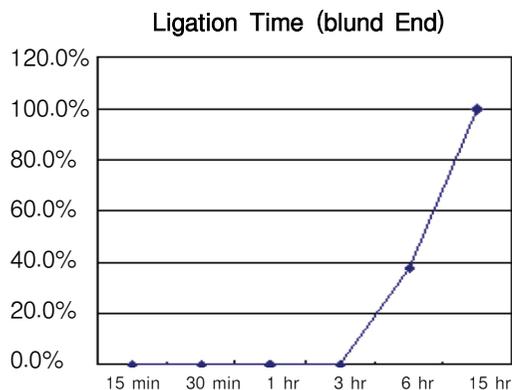


图 2. 平滑末端连接的时间曲线

将 18 kb Insert DNA/*Sma* I 与 pUC118/*Hinc* II/BAP 按标准方法进行连接, 连接产物化学转化感受态细胞, 在 LB-amp 平板 37°C 培养过夜。计数平板上的菌落数, 每个时间点的菌落数比率如图显示, 以 15 小时出现的菌落数比率为 100% 计算。

5. 电穿孔法转化。

- 1) 通常化学转化法可以转化约 20 kb 以下的连接产物，而电穿孔转化法效率很高，可以转化 20 kb 以上的长链 DNA 连接产物甚至是文库。
- 2) 本实验的连接反应液不能直接进行电穿孔法转化，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，不要使用苯酚/氯仿分离，防止长链连接产物断裂。
- 3) *E. coli* 有限制外源 DNA 的机制，例如 *hsdRMS* 编码的 *EcoK I* 限制系统，*mcrA*、*mcrB*、*mcrC*、*hsdRMS*、*mcr*、*mrr* 编码的甲基化的限制系统。这些系统对外源 DNA 特别是长链 DNA 的克隆有影响，会导致克隆转化效率大幅下降，目的 DNA 难以克隆。为了避免这种现象，建议使用相关基因缺失的大肠杆菌（如 HST08 等）进行长链 DNA 的转化。

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

E. coli HST08 Premium Electro-Cells (Code No. 9028)

HST08基因型:

F^- , *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*, $\phi 80d/lacZ \Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)U169$, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Delta mcrA$, λ^-

6. DropDialysis 法置换 Buffer（用于电穿孔法转化）¹⁾。

- 1) 将培养皿（直径 120 mm）置于冰中，加入 10 倍稀释的 TE Buffer(1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0) 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 Type VS membrane 上。
- 4) 盖上皿盖，于冰上透析 3 小时，每隔 30 min-1 h 轻柔搅拌 1/10 TE buffer。
- 5) 使用切掉尖端的 Tip 小心回收透析 DNA，并转移至微量离心管中。
- 6) 取 1-10 μ l 连接液加入 *E.coli* Electro Cells 中进行电转化。

● 参考文献

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

● 关联产品

Stellar™ Competent Cells (Code No. 636763/636766)

Stellar™ Electrocompetent Cells (Code No. 636765)

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

T4 Polynucleotide Kinase (Code No. 2021S/A/B)

T4 DNA Polymerase (Code No. 2040A/B)

PrimeSTAR is a registered trademark of TAKARA BIO INC.

Stellar is a trademark of Takara Bio USA, 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>

v201707Da