



Ligation high

-DNA Ligation Kit-

(Code No.:LGK-100,LGK-101)

中文说明书

LGK-100 375ul 25T-150T

LGK-101 750ul 50T-300T

TOYOBO CO.,LTD.Biochemical Operations Department

OSAKA JAPAN

Distributor:Shanghai SOLOMON bio-sci&tech,Co.Ltd.

Tel:+86-21-33782046 Email:order@solomonbio.com

— 目录 —

[1] 前言	1
[2] 产品内容.....	1
[3] 操作步骤.....	1
[4] 产品特征.....	2
[5] 使用实例.....	5
[6] 相关产品.....	7

本试剂盒内包含的试剂全部为研究用，请勿将其作为诊断及临床试剂使用。使用本试剂盒时，请严格遵守实验室内的常规注意事项及安全。

[1] 前言

DNA 片段的连接反应是在遗传基因操作实验中的常用操作。在以往的连接反应中，要根据不同的底物设置不同的条件，还要分别添加各自不同的反应组成成分，比较复杂麻烦。另外，在进行插入连接时，要得到较高的转化效率也十分困难。

因此，TOYOBO公司为了解决此类问题，开发了操作简便而高效的试剂盒。本试剂盒的反应液中包括了所有连接反应所需要的试剂，适用于多种类型的连接反应。另外，本说明书介绍了使用Ligation high时的标准结果。

[2] 产品内容

本产品包含以下成份：

内容	LGK-100	LGK-100
Ligation high	375ul	375ul×2

- ◆请在-20℃条件下保存。
- ◆LGK-100如果每次使用方法2.5ul可以使用150次，如果每次使用15ul可以使用方法20T。

[3] 操作步骤

1. 使用方法

- 请将本品保存在-20℃以下环境中。
- 在冰上进行Ligation high 的融解。将其放置在冰上5-10分钟便自然融解。
- 配制准备连接用的DNA溶液。
- 取DNA溶液加入等量至半量的Ligation high，混匀。
- 在16℃下反应30 分钟。
- 反应完成后，其反应液可以直接使用于转化。

2. 注意事项

- 进行高效连接时，效率较低时，使用乙醇沉淀等提纯DNA。
- 要控制反应液量时，可减少DNA液体的使用量，和相当于其半量的Ligation high进行混合。

- 注意在活性细胞中添加大量的反应液会降低转化的效率。需要添加大量反应液时，要先用乙醇沉淀等将DNA进行浓缩。
- 连接效率受盐浓度的影响。要进行高效率的连接反应时，先用不含盐的TE buffer (10mM Tris-HCl, pH8.0/1mM EDTA) 将DNA溶解后再进行连接反应。

[4] 产品特征

1. 优良的连接反应效率
和单独使用T4 DNA Ligase相比能获得50倍以上的效率。
2. 少量液体便可进行反应。
将等量到半量的Ligation high 和DNA 溶液混合使用。

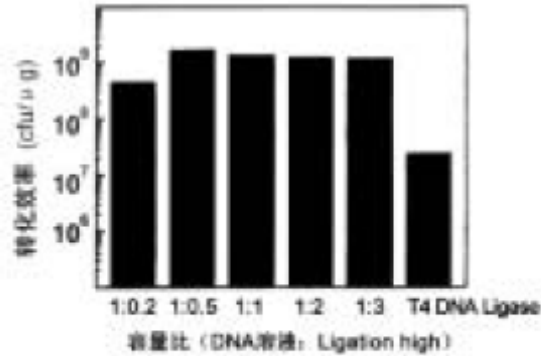


图 1 容量比(DNA 溶液:Ligation high)导致的转换效率转换的效的不同

3. 优良的稳定性
即使反复进行50 次冻结和融解仍然未见连接效率下降

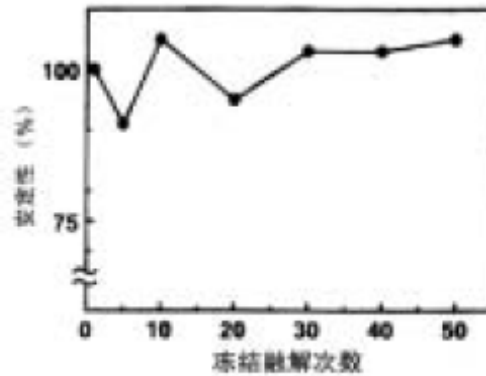


图 2 冻结融解对转化效率的影响

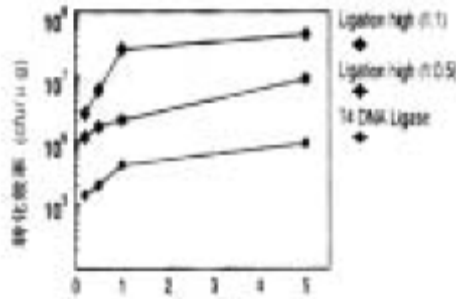
[5] 实验实例

1. 插入连接

(1) 方法

- 配制在脱磷酸化的pBluescript II /BanIII(50ng,25fmol)中加入了pUC18/Taq I 的1,444bp 片断(5~125ng,5~125fmol)的DNA溶液5 μ l。
- 取DNA 溶液和等量(5 μ l)或半量(2.5 μ l)的Ligation high 混合，在16°C条件下反应30分钟。
- 取E.coli JM109 的感受态细胞¹在2 μ l 反应液中进行转化，将其在含有X-Gal、IPTG以及氨苄青霉素的LB培养皿上培养，根据其生成的菌落数量推测转化效率。
- 使用T4 DNA Ligase 的16hr 反应液作对照。

(2) 结果和结论



插入物/底物的摩尔比
图 3 影响连接反应效率的插入物/底物的摩尔比
表 2 白色菌落的比例

插入物/底物 (摩尔比)	Ligation high (容量比 1:1)	Ligation high (容量比 1:0.5)	T4 DNA Ligase
0.2	52	63	12
0.5	50	65	21
1.0	56	61	27
5.0	66	72	39

• 插入物/底物的摩尔比在 1.0 以上时可以得到较好的结果。

^{*1} 转化效率是 1.07×10^9 cfu/ μ g pBluescript II

2. linker 连接

(1) 方法

- 配制DNA 溶液在脱磷酸化的pBluescript II /Hinc II (100ng,50fmol) 中加入了脱磷酸EcoR I linker (2.6~130ng,0.5~25pmol)的DNA 溶液5 μ l。
- 取DNA 溶液和等量(5 μ l)或半量(2.5 μ l)的Ligation high 混合，在 16℃条件下反应30 分钟。
- 取E.coli JM109 的感受态细胞*¹ 在2 μ l 反应液中进行转化，转化液在含有X-Gal、IPTG 以及氨苄青霉素的LB 培养皿上培养，根据其生成的菌落数量推测转化效率。
- 使用T4 DNA Ligase 的16hr 反应液作对照。

(2) 结果和结论

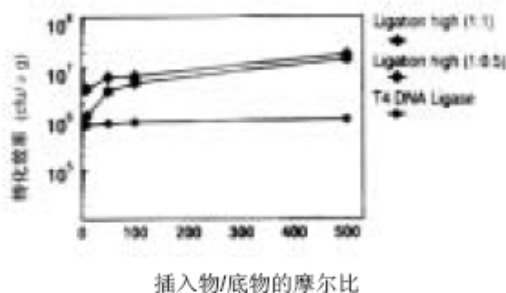


图 3 影响连接反应效率的插入物/底物的摩尔比

表 2 菌落的比例 (%)

插入物/底物 (摩尔比)	Ligation high (容量比 1:1)	Ligation high (容量比 1:0.5)	T4 DNA Ligase
10	51	57	23
50	54	65	24
100	57	64	38
500	54	76	38

• 插入物/底物的摩尔比在 100 以上可以得到较好的结果。

*¹ 转化效率是 1.07×10^9 cfu/μg pBluescript II

3. 噬菌体连接

(1) 方法

- 配制在 λ ZAP II 的 EcoR I arm(250ng) 中加入 Test Insert(200ng) 的 DNA 溶液 $5 \mu\text{l}$ 。
- 取 DNA 溶液和等量($5 \mu\text{l}$)或半量($2.5 \mu\text{l}$)的 Ligation high 混合, 在 16°C 或 26°C 下反应 10 分钟到 1 个小时。
- 取反应液 $4 \mu\text{l}$ 和 GIGAPACK III old 进行体内包装, 并使其感染 E.coli XL1-Blue, 测量转化效率。
- 使用 T4 DNA Ligase 的 16hr 反应液作对照。

(2) 结果和结论

表 3 噬菌体连接反应中反应条件的影响

(pfu/ μg λ ZAP II)

反应条件	Ligation high (1:1)	Ligation high (1:0.5)	T4 DNA Ligase
$16^\circ\text{C} \times 10\text{min}$	2.20×10^5	7.68×10^6	-
$16^\circ\text{C} \times 30\text{min}$	5.20×10^5	8.32×10^6	-
$16^\circ\text{C} \times 60\text{min}$	3.00×10^6	1.15×10^7	-
$16^\circ\text{C} \times 16\text{hr}$	3.21×10^6	9.35×10^6	2.15×10^5
$26^\circ\text{C} \times 10\text{min}$	4.80×10^5	5.12×10^6	-
$26^\circ\text{C} \times 30\text{min}$	1.20×10^6	3.20×10^6	-
$26^\circ\text{C} \times 60\text{min}$	2.00×10^6	3.84×10^6	-
$26^\circ\text{C} \times 16\text{hr}$	1.19×10^6	3.56×10^6	3.09×10^5

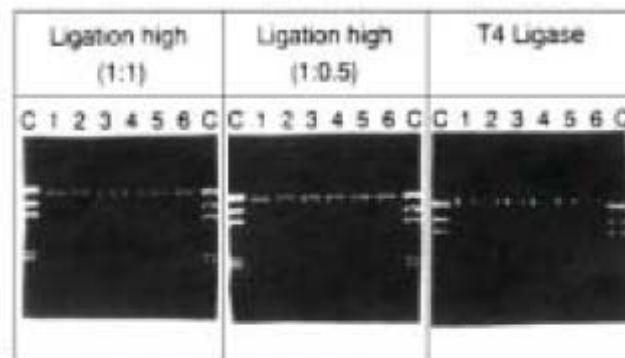
- 反应温度在 16°C 到 26°C 之间连接反应的效率没有显著的差别。
- 反应 30 分钟, 显示可以得到充分的连接反应效率。

4. 通过电泳进行确认

(1) 方法

- 取 λ /Hind III 的片段(500ng)5 μ l 和等量(5 μ l)或半量(2.5 μ l)的 Ligation high 混合，使其在16 $^{\circ}$ C下进行反应。
- 反应结束后，使用乙醇沉淀回收DNA，在1%的凝胶中进行电泳。
- 使用T4 DNA Ligase 的反应液作对照。

(2) 结果和结论



C: Control (未处理)
 1: 16 $^{\circ}$ C x 5min 4: 16 $^{\circ}$ C x 30min
 2: 16 $^{\circ}$ C x 10min 5: 16 $^{\circ}$ C x 1hr
 3: 16 $^{\circ}$ C x 20min 6: 16 $^{\circ}$ C x 16hr

图 4 连接反应液电泳条带图

- λ /Hind III 反应 5 分钟即被连接。

注意:

- 受片段末端形状的影响，有时连接反应较难完成，所以在连接效率较低时，请尝试延长反应时间。
- 反应液可以当作电泳的样品，但要得到明显的电泳条带时，请先通过乙醇沉淀进行缓冲液交换。

5. 盐浓度的影响

(1) 方法

- 将pBluescript II /Sca I (5ng)溶解在添加了盐(NaCl)的TE buffer 5 μ l 中。
- 取DNA 溶液和等量(5 μ l)或半量(2.5 μ l)的Ligation high混合, 在 16 $^{\circ}$ C条件下反应30 分钟。
- 取E.coli JM109 的感受态细胞*¹ 在2 μ l 反应液中进行转化, 将其在氨苄青霉素的LB 培养皿上培养, 根据其生成的菌落数量推测转化效率。

(2) 结果和结论

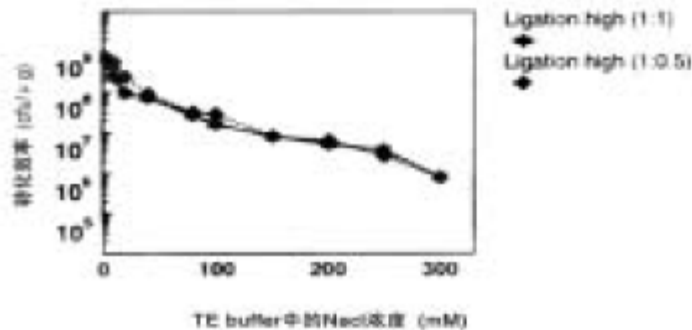


图 5 自身连接的转化效率

- 如果溶解DNA 的buffer 中含有盐, 转化效率有可能降低。要获得较高的转化效率时, 请将DNA 溶解在不含有盐的TE buffer 中。

*¹ 转化效率是 1.17×10^9 cfu/ μ g pBluescript II

[6] 相关产品

货号	品名	规格
LGK-201	高效连接试剂盒-Ligation high Ver.2	750ul
BLK-101	高效平滑末端连接试剂盒—Blunting high	20T
TAK-101	TA 克隆试剂盒(粘末端)-TArget Clone	10T
TAK-201	TA 克隆试剂盒平末端-TArget Clone TM -Plus	10T
DNA-001	λphage DNA	400ug
DNA-030X	100bp DNA ladder marker	100T
DNA-031	200bp DNA ladder marker	100T
DNA-032	1kp DNA ladder marker	100T
GEP-101W	迷你型琼脂糖电泳装置—GelMate 2000	1 套
KFX-101	最高性能的 PCR 酶(NEW!)-KOD FX	200U
KOD-201	最高保真水平 PCR 酶-KOD-PLUS-	200U
KOD-211	最高保真水平 PCR 酶-KOD-PLUS-Ver.2	200U
LDP-101	高速度高效率的 PCR 酶-KOD-DASH	250U

[Manufacturer]

TOYOBO CO.,LTD.

Biochemical Operations Department

OSAKA JAPAN

[代理商]

上海硕盟生物科技有限公司

上海浦东新区高科西路 3000 弄 35 号

邮编: 201204

[联系方式]

Tel:+86-21-33782046 33782006

Email:order@solomonbio.com

Http: www.solomonbio.com