

# 5min Universal Ligation Mix

C311-01/02

Version 10.1



Vazyme biotech co., ltd.

## 产品概述

5min Universal Ligation Mix是一种酶和Buffer混合的即用型2 × 预混液，内含T4 DNA ligase，催化双链DNA或RNA上相邻的5'-磷酸末端和3'-羟基末端形成磷酸二酯键。本试剂盒不仅适用于黏性末端连接，也兼容平滑末端和单碱基突出末端的DNA连接，优化的连接增强剂及反应缓冲液使反应更加高效便捷，25°C反应5 min即可快速连接，连接产物可直接转化多种化学感受态细胞。

## 产品组分

组 分	C311-01 (50 rxn)	C311-02 (100 rxn)
2 × Universal Ligation Mix <sup>a</sup>	250 μl	2 × 250 μl

a 包含酶和Buffer的2 × 预混液

## 保存条件

-30 ~ -15°C保存。运输条件：≤0°C。

## 应用

- ◇黏性末端连接
- ◇平滑末端连接
- ◇TA连接
- ◇Linker或Adapter连接

## 实验原理示意图

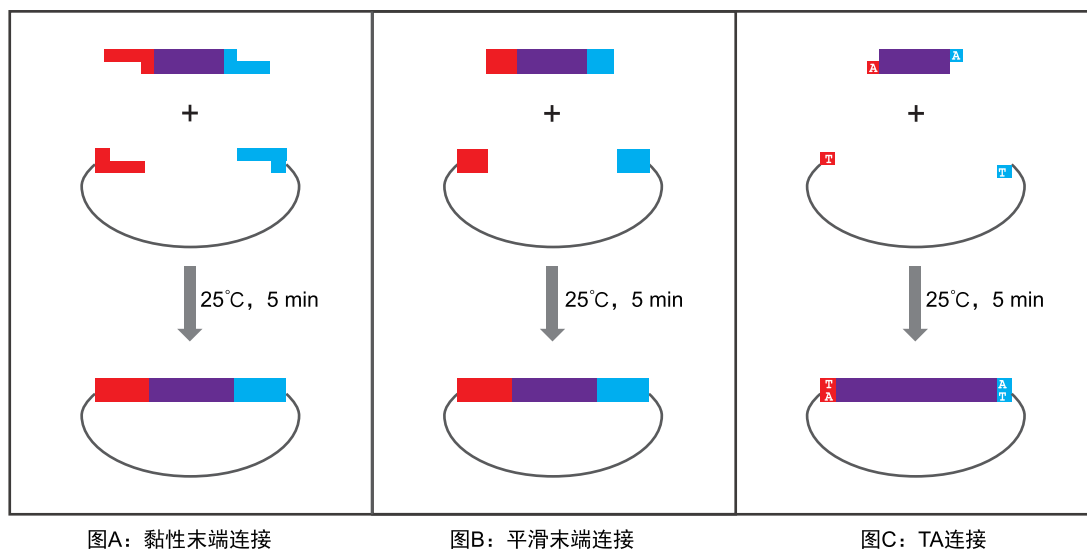


Fig 1. 5min Universal Ligation Mix实验原理示意图

## 实验流程

### 1. 连接反应

1) 于冰上配制以下反应体系:

组分	体积
载体	0.03 pmol
插入片段	0.03 - 0.3 pmol
2 × Universal Ligation Mix	5 μl
ddH <sub>2</sub> O	to 10 μl

**最适载体使用量 (0.03 pmol) = [0.02 × 克隆载体碱基数] ng**

**最适插入片段使用量 (0.09 pmol) = [0.06 × 插入片段碱基数] ng**

例如, 将长度为1 kb的插入片段克隆至长度为4 kb的克隆载体时, 克隆载体的最适使用量为:  $0.02 \times 4000 = 80$  ng; 插入片段的最适使用量为:  $0.06 \times 1000 = 60$  ng。

①载体:插入片段的摩尔比为1:1~1:10, 推荐最适摩尔比为1:3。

②载体最适投入量为20 - 100 ng; 当使用上述公式计算DNA最适使用量超出这个范围时, 直接选择最低/最高使用量即可。

③平末端载体与插入片段进行连接时, 应首先将载体进行去磷酸化处理, 防止其自身环化。

④推荐使用Nanodrop、Onedrop、Qubit等进行浓度测定。

2) 使用移液器轻轻吸打混匀(请勿振荡混匀), 短暂离心将反应液收集至管底。

3) **反应条件: 25°C, 5 min;** 降至4°C或立即置于冰上冷却。

①其它连接条件: 4°C或16°C, 连接过夜。

②当载体和插入片段总体积大于5 μl时, 可将反应体系放大至20 μl。当进行平滑末端或TA连接时, 可适当延长反应时间以提高连接效率, 但建议不超过2 h。

③连接产物需要经过回收柱或乙醇沉淀法等纯化DNA后, 才能用于电穿孔法转化。

④连接产物可于-20°C存放一周, 待需要时解冻转化即可。

### 2. 连接产物转化

1) 将克隆用的化学感受态细胞置于冰上解冻(如: Fast-T1化学感受态细胞, Vazyme #C505)。

2) 取**5 - 10 μl连接产物**加入到100 μl感受态细胞中, 轻弹管壁混匀(请勿振荡混匀), 冰上静置30 min。

▲连接产物转化体积最多不应超过所用感受态细胞体积的1/10。

3) 42°C水浴热激30 sec后, 立即置于冰上冷却2 - 3 min。

4) 加入900 μl SOC或LB液体培养基(不添加抗生素), 37°C摇菌1 h(转速200 - 250 rpm)。

5) 将相应抗性的LB固体培养基平板在37°C培养箱中预热。

6) 5,000 rpm离心5 min, 弃掉900 μl上清。用剩余培养基将菌体重悬, 用无菌涂布棒在含有正确抗性的平板上轻轻涂匀。

7) 37°C培养箱中倒置培养12 - 16 h。

### 3. 阳性克隆鉴定

菌落PCR鉴定; 酶切鉴定; 质粒鉴定; 测序分析。



ISO 9001: 2015