



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 010-82598075

Fax: 010-82597807

<http://www.real-times.com.cn>

E-mail: real-times@vip.163.com

2× ligation solution MasterMix

● 产品组成:

货号	名称	规格
RTV701	2× ligation solution MasterMix	150 µl

注：按照 10µl 连接体系计算，每次使用 5µl，可以使用 30 次。

● 保存：-20℃

● 产品简介:

2× ligation solution MasterMix 是含有 T4 DNA Ligase, ligation buffer 的 2× MasterMix, 实验时，只需加入片段和载体即可进行连接反应。

适用于 DNA 片段和载体 DNA 的连接以及 DNA 片段和 Linker 或 Adaptor DNA 的连接。

● 注意事项

1. 2× ligation solution MasterMix 由于含有 T4 DNA ligase，使用前冰浴中彻底融化，混匀后使用。
2. 为了提高转化效率，转化时建议所加入连接产物的量不要超过感受态细胞体积的 10%。

● 使用方法:

一 DNA 片段和载体 DNA 的连接

1) 粘性末端的连接

1. 反应体系:

	10µl 体系	终浓度
线性载体 DNA	x µl	10-50 ng
插入 DNA 片段	y µl	插入片段: 载体=1:1-5:1*
2× ligation solution MasterMix	5 µl	1×
ddH ₂ O	up to 10 µl	

*: 载体与插入片段的摩尔数比需要优化：一般 vector:insert 在 1:1~1:5 之间均可得到较好的结果。用以下公式计算片段摩尔数: pmol 数= DNA 量(ng)/(660×片段 bp 数)×1000。例如：插入片段 2000bp，线性载体为 3000bp，如果载体使用量为 50ng (0.025pmol)，10µl 连接体系中 vector:insert 的摩尔比是 1:3，则需要 2000bp pmol 数为 0.075pmol，插入片段 2000bp 的使用量为 100ng。

2. 彻底轻柔混匀后，瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底。

3. 反应条件：16℃ 孵育 30 分钟。

4. 可取 5 μl 连接产物热击转化 50 μl 感受态细胞或取 1-2 μl 连接产物电击转化 50 μl 感受态细胞。

注：1) 若要提高电转实验效率，推荐 65℃ 孵育 10 分钟或 70℃ 孵育 5 分钟以灭活 T4 DNA Ligase 后，用 DNA 产物纯化试剂盒或氯仿抽提对连接后的 DNA 片段进行纯化后进行电击转化。

2) 若要提高转化子数目，可将连接时间延长至 1 小时。

2) 平末端的连接

1. 反应体系:

	10μl 体系	终浓度
线性平末端载体 DNA*	x μl	10-50 ng
插入 DNA 片段	y μl	插入片段: 载体=1:1-5:1**
2× ligation solution MasterMix	5 μl	1×
ddH ₂ O	up to 10 μl	

*: 平滑末端的载体与 DNA 片段进行连接时，应首先将载体进行去磷酸化处理，以防止其自身环化。

**：载体与插入片段的摩尔数比需要优化：一般 vector:insert 在 1:1~1:5 之间均可得到较好的结果。用以下公式计算片段摩尔数： $\text{pmol 数} = \frac{\text{DNA 量}(\text{ng})}{(660 \times \text{片段 bp 数})} \times 1000$ 。例如：插入片段 2000bp，线性载体为 3000bp，如果载体使用量为 50ng (0.025pmol)，10μl 连接体系中 vector:insert 的摩尔比是 1:3，则需要 2000bp pmol 数为 0.075pmol，插入片段 2000bp 的使用量为 100ng。

2. 彻底轻柔混匀后，瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底。

3. 反应条件：16℃ 孵育 30 分钟。

4. 可取 5 μl 连接产物热击转化 50 μl 感受态细胞或取 1-2 μl 连接产物电击转化 50 μl 感受态细胞。

注：1) 若要提高电转实验效率，推荐 65℃ 孵育 10 分钟或 70℃ 孵育 5 分钟以灭活 T4 DNA Ligase 后，用 DNA 产物纯化试剂盒或氯仿抽提对连接后的 DNA 片段进行纯化后才能进行电击转化。

2) 若要提高转化子数目，可将连接时间延长至 1 小时。

二 线性 DNA 的自身环化

1. 反应体系:

	10μl 体系	终浓度
线性载体 DNA	x μl	10-50 ng
2× ligation solution MasterMix	5 μl	1×
ddH ₂ O	up to 10 μl	

2. 彻底轻柔混匀后，瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底。

3. 反应条件：16℃孵育 30 分钟。

4. 可取 5 μl 连接产物热击转化 50 μl 感受态细胞或取 1-2 μl 连接产物电击转化 50 μl 感受态细胞。

注：1) 若要提高电转实验效率，推荐 65℃孵育 10 分钟或 70℃孵育 5 分钟灭活 T4 DNA Ligase 后，用 DNA 产物纯化试剂盒或氯仿抽提对连接后的 DNA 片段进行纯化后才能进行电击转化。

三 接头连接

1. 反应体系:

	10μl 体系	终浓度
线性 DNA	x μl	100-300 ng
磷酸化接头	y μl	0.5-1 μg
2×ligation solution MasterMix	5 μl	1×
ddH ₂ O	up to 10 μl	

2. 彻底轻柔混匀后，瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底。

3. 反应条件：16℃孵育 30 分钟。

4. 65℃孵育 10 分钟或 70℃孵育 5 分钟灭活 T4 DNA Ligase。连接产物可以直接进行限制性内切酶酶切反应。