

T4 DNA Ligase

T4 DNA 连接酶

产品编号	产品名称	规格
BL1229A	T4 DNA连接酶	1000 U

产品简介:

T4 DNA 连接酶由携带 T4 噬菌体 gene 30 的大肠杆菌产生。该酶催化双螺旋 DNA 或 RNA 之间的 5'-磷酸基团和 3'-羟基之间形成磷酸二酯键。该酶在双链 DNA、RNA 或者 DNA/RNA 复合物间可修复单链缺刻, 并且可以连接有粘性末端或者平末端的 DNA 片段, 但对于单链核酸无活性, 主要用于限制性内切酶酶切产物 DNA 片段克隆、基因定点突变与 PCR 产物克隆、线性 DNA 自环化与修复双链 DNA 缺刻。T4 DNA Ligase 需要 ATP 作为辅助因子, 在室温下完成粘性末端连接反应仅需 10 分钟。

产品组分:

组分名称	规格
T4 DNA Ligase	200 μ L
10 \times T4 DNA Ligase Buffer	1mL
50% PEG	1mL

注: 1 U=1 Weiss unit

酶活单位定义:

37 $^{\circ}$ C条件下, 1 Weiss unit 的酶在 20 min 内催化 1 nmol 的 [32 PPi]转变为活性炭吸附态。1 Weiss unit 等同于约 200 个粘性末端连接反应单位 (CEU), 相当于在 16 $^{\circ}$ C条件下, 30 min 内连接 50% HindIII 消化后的 λ DNA 片段。

质量控制:

核酸内切酶残留检测: 37 $^{\circ}$ C 条件下, 将 200 U 的 T4 DNA Ligase 与 1 μ g 的 pUC19 DNA 中温育 4 h, 未检测出由共价闭合环状 DNA 转变为带有缺刻的 DNA。

核酸外切酶残留检测: 将酶液与双链 DNA 底物在 37 $^{\circ}$ C温育 16 h, 通过 DNA 电泳检测双链 DNA 底物无变化。

使用方法:

1. DNA 插入片段连接至载体 DNA (粘性末端连接)

(1) 于冰上配制如下反应体系:

试剂	用量
线性化载体 DNA	20~100 ng
插入片段 DNA	3:1~10:1 (片段: 载体摩尔比)
10 \times T4 DNA Ligase Buffer	2 μ L
T4 DNA Ligase	1 U (0.2 μ L)
Nuclease-Free Water	To 20 μ L

(2) 充分混匀并瞬离, 22 $^{\circ}$ C温育 10 min;

(3) 取 1~5 μ L 的连接产物用于 50 μ L 化学感受态细胞的转化, 或者取 1~2 μ L 用于 50 μ L 电感受态细胞的转化。

注: 如果连接反应产物用于电转化, 应使用离心柱或者氯仿抽提清洁 DNA 代替热失活步骤。

2. DNA 插入片段连接至载体 DNA (平末端连接)

(1) 于冰上配制如下反应体系:

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



试剂	用量
线性化载体 DNA	20~100 ng
插入片段 DNA	3:1~10:1 (片段: 载体摩尔比)
10×T4 DNA Ligase Buffer	2 μL
50% PEG	2 μL
T4 DNA Ligase	5 U (1 μL)
Nuclease-Free Water	To 20 μL

- (2) 充分混匀并瞬离, 22°C温育 1 h;
 (3) 取 1~5 μL 的连接产物用于 50 μL 化学感受态细胞的转化, 或者取 1~2 μL 用于 50 μL 电感受态细胞的转化。

注: 如果连接反应产物用于电转化, 应使用离心柱或者氯仿抽提清洁 DNA 代替热失活步骤。

3. 线性 DNA 自环化

- (1) 于冰上配制如下反应体系:

试剂	用量
线性化 DNA	10~50 ng
10×T4 DNA Ligase Buffer	5 μL
T4 DNA Ligase	5 U (1 μL)
Nuclease-Free Water	To 50 μL

- (2) 彻底混匀并瞬离, 22°C温育 10 min;
 (3) 取 1~5 μL 的连接产物用于 50 μL 化学感受态细胞的转化, 或者取 1~2 μL 用于 50 μL 电感受态细胞的转化。

注: 如果连接反应产物用于电转化, 应使用离心柱或者氯仿抽提清洁 DNA 代替热失活步骤。

4. 接头连接

双链寡核苷酸接头经常被用于在插入片段上产生粘性末端。接头通常包含限制酶识别位点, 在连接后经酶切处理产生和克隆载体匹配的粘端。有时候接头已包含与克隆载体匹配的粘端, 此时无需在接头连接完成后进行插入片段的进一步处理。

- (1) 于冰上配制如下反应体系:

试剂	用量
线性化 DNA	100~500 ng
磷酸化接头	1~2 μg
10×T4 DNA Ligase Buffer	2 μL
50% PEG	2 μL
T4 DNA Ligase	2 U (0.4 μL)
Nuclease-Free Water	To 20 μL

- (2) 彻底混匀并瞬离, 22°C温育 10 min;
 (3) 在 65°C作用 10 min 或者 70°C作用 5 min, 进行热失活。

注: 添加 1 mM ATP 的条件下, T4 DNA Ligase 在内切酶反应缓冲液中具有 100% 的活力。因此, 接头连接反应时可以在内切酶反应缓冲液中进行, 以简化“接头连接 - 酶切”实验流程。具体方法为: 向接头连接体系中添加 ATP 至终浓度 1 mM, 接头连接反应完成后, 先失活 T4 DNA Ligase。然后, 再在体系中加入适量的快速限制性内切酶, 最后使用最适酶切反应温度进行温育即可。

注意事项:

- 1、本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
- 2、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

-20°C储存, 2 年有效。

