



Salt -T4 DNA ligase

1、概述

Salt-T4 耐盐 DNA 连接酶是 T4 DNA 连接酶的耐盐变体，可催化双链 DNA 上相邻的 5'-磷酸末端和 3'-羟基末端形成磷酸二酯键，比野生型 T4 DNA 连接酶更耐受高盐条件。该酶在盐浓度高达 300mM 的情况下仍能连接粘性末端而不丧失任何活性。

2、产品组分

| 组分 | BM0467S 20000U | BM0467L 100000U |
|--|-------------------|--------------------|
| Salt -T4 DNA ligase (400U/ul) | 50ul | 250ul |
| 10× Salt T4 DNA Ligase Reaction Buffer | 1ml | 1ml |
| 2× StickTogether T4 DNA Ligase Buffer | 1ml | 1mlX3 |

3、酶储存液及保存条件

10 mM Tris-HCl (pH 7.4 @ 25°C)、50 mM KCl、1 mM DTT、0.1 mM EDTA、50% Glycerol。

-30~-15°C 保存，避免反复冻融。

4、反应缓冲液

(1) 10X Salt T4 DNA Ligase Reaction Buffer:

500 mM Tris-HCl

100 mM MgCl₂

10 mM ATP

100 mM DTT

(pH 7.5 @ 25°C)。

(2) 2X StickTogether T4 DNA Ligase Buffer :

132mM Tris-HCl

20 mM MgCl₂

2 mM ATP

2mM DTT

15% Polyethylene glycol (PEG 6000)

pH 7.6@25°C。

5、适用场景

限制性酶切片段的克隆；

将连接子 (linkers) 和接头 (adapters) 连接到 DNA 片段的平末端。

6、活性单位定义

在 20 μl 反应体系中，含 100 mM NaCl 的 1X T4 DNA 连接酶反应缓冲液条件下，25°C 温浴 30 分钟能连接 50% 的 6 μg HindIII 消化的 Lambda DNA 所需的酶量为 1 单位。

7、使用方法

(1) 下述组分均置于冰上，其中 Salt- T4 DNA Ligase 最后加入。

(2) 反应体系：下述按照载体与插入片段摩尔比 1:3 为例。

| Cohesive End Ligation: COMPONENTS | 20 μl REACTION | Blunt/TA Overhang Ligation: COMPONENTS | 20 μl REACTION |
|--------------------------------------|----------------------|---|----------------------|
| T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10X) | 2 μl | StickTogether DNA Ligase Buffer (2X) | 10 μl |
| Vector DNA (4 kb) | 50 ng (0.020 pmol) | Vector DNA (4 kb) | 50 ng (0.020 pmol) |
| Insert DNA (1 kb) | 37.5 ng (0.060 pmol) | Insert DNA (1 kb) | 37.5 ng (0.060 pmol) |
| Nuclease-free water | to 20 μl | Nuclease-free water | to 20 μl |
| Salt-T4 DNA Ligase | 1 μl | Salt-T4 DNA Ligase | 1 μl |

注意：上述 T4 DNA Ligase Reaction Buffer 解冻并重悬混匀后使用；

氯化钠需选择性加入,通常氯化钠在终浓度 300mM 下活性不受影响,但是在终浓度 500mM 下活性约保持 50%;而 Blunt/TA Overhang Ligation 中对氯化钠更敏感,建议氯化钠浓度 \leq 100 mM。

(3) 轻吹混匀,对于 Cohesive End Ligation,室温(20-25℃)孵育 10 分钟;在 65℃下加热灭活 10 分钟。对于 Blunt/TA Overhang Ligation,在室温(20-25℃)孵育 10 分钟或 16℃过夜;不要热失活反应,否则 Stick Together DNA 连接酶缓冲液中 PEG 受热会抑制转化。

8、注意事项

- (1) ATP 是反应中必不可少的辅因子。这与需要 NAD 作为辅因子的 E. coli DNA 连接酶不同。
- (2) 若需将 Salt-T4 耐盐 DNA 连接酶稀释随后以 -20℃ 储存,推荐使用含 50% 甘油的贮存缓冲液;如稀释后立即使用,也可使用 1X T4 DNA 连接酶反应缓冲液。
- (3) 酶使用时置于冰上,用完后立即放回-20℃。
- (4) 本产品仅用于科研用途;为保证安全,请穿戴实验服、一次性手套进行操作。