



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	1mlX5

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。