



T4 DNA Ligase

产品信息:

组成	CL301-01	CL301-02	CL301-03
T4 DNA Ligase (5U/μl)	500U	500U×10	100U
5×T4 DNA Ligation Buffer	400μl	400μl×10	200μl

浓度: 5U/μl

产品概述:

在有 Mg^{2+} 和 ATP 存在的条件下, T4 DNA Ligase 能催化双链 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。该酶不仅能够催化双链 DNA 的平末端或粘性末端之间的连接, 还可以修复双链 DNA、RNA 或 DNA/RNA 杂交双链中的单链切刻, 但不能催化单链 DNA 之间的连接。

保存条件: -20℃ 保存。

酶储存缓冲液:

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50mM KCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 50% (v/v) glycerol。

5 × T4 DNA Ligase Buffer

250 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50mM $MgCl_2$, 50mM DTT, 5mM ATP, 连接促进剂。

来源: 纯化于携带 T4 DNA ligase 基因的 *E. coli* 菌株。

抑制剂和热失活: 大于 200mM 的 NaCl 或 KCl 可以强烈抑制连接酶活性。65℃ 加热 10 分钟或 70℃ 加热 5 分钟即可失活。

单位定义:

在 37℃, 20 分钟内交换 1 nmole 的 ^{32}P Pi 所需要的酶量定义为一个 Weiss 单位。本产品酶 1U (Weiss Unit) 相当于 200 个粘性末端单位。在 T4 DNA 连接酶反应缓冲液中, 16℃ 条件下, 30 分钟能够使 50% 的经 Hind III 消化的 λDNA 片段连接所需要的酶量为一个粘性末端单位。

质量控制:

蓝白斑分析实验表明白斑数小于 2%; 过量 T4 DNA Ligase 混合超螺旋质粒检测实验表明无核酸酶检出; SDS-PAGE 检测重组蛋白纯度大于 99%。

应用: 双链 DNA 粘性末端和平末端的连接; TA 克隆; 双链 DNA 的切刻修复等。

连接反应体系:

1. 在一个无菌 0.2ml 的 PCR 管中加入以下成分

成分	体积
5×T4 DNA Ligase Buffer	2μl
载体 (50-100ng/μl)	Xμl
片段	Yμl
T4 DNA Ligase (5U/μl)	1μl
灭菌水	补至 10μl

用手指轻弹管底混匀各成分, 离心数秒使反应混合物沉到管底。

2. 反应条件

粘性末端连接: 25℃ 反应 5-10 分钟。

平末端连接或者一个平端另一个为粘端的连接: 25℃ 反应 30-60 分钟。

3. 连接载体和片段的使用量

连接载体和片段的量一般按照摩尔比 1:3-1:10 进行, 片段使用量比载体使用量大, 载体和片段的使用量一般为 50-100ng 之间。例如, 3kb 的载体和 0.5kb 片段按摩尔比 1:3 的连接反应。假如使用 50ng 的 3kb 载体, 那么 0.5kb 的片段需要量计算方法为:

$$[(50ng \times 0.5kb) \div 3kb] \times (3 \div 1) = 25ng$$

4. 转化

连接完成后，取 5-10 μ l 连接产物加到合适的感受态细胞中，按照感受态细胞说明书中所叙述的转化步骤进行转化。连接反应结束后不能转化时，可将连接产物置于-20℃冰箱中保存。

注意事项：

1. 化冻 5 $\times$ T4 DNA Ligase Buffer 后，需要混匀后再使用。
2. T4 DNA Ligase 最适活性温度为 37℃，但是高温连接形成的连接产物的转化效率会大大降低，所以选用 25℃或 16℃等稍低的连接温度。如果连接产物不用转化且需要高的连接效果，可以在 37℃条件下进行。
3. 该酶需要 Mg^{2+} 为激活剂，因此螯合 Mg^{2+} 的 EDTA 的存在会阻碍连接反应。溶解于高浓度 EDTA 缓冲液的 DNA 需要用灭菌水或 TE 缓冲液进行置换。

BM190306