

T4 DNA Ligase 产品简介

该酶催化相邻DNA链的5'-P末端和3'-OH末端以磷酸二酯键结合的反应，需ATP作辅酶。本酶不仅可以催化粘性末端之间或平滑末端之间的DNA的连接，也可以催化DNA与RNA之间以及少数RNA之间的连接，修复双链DNA、RNA、DNA/RNA杂交链中的单链切口

起源

Escherichia coli carrying the plasmid that enable highly expression of T4 DNA Ligase gene.

酶贮存溶液:

10 mM Tris-HCl (pH 7.5),
0.1 mM EDTA,
50 mM KCl,
1 mM DTT,
50% Glycerol
and 200 µg/ml Nuclease free BSA.

活性定义

在20 µl的连接反应体系中，6 µg的λ DNA-Hind III的分解物在16℃下反应30分钟时，有90%以上的DNA片段被连接所需要的酶量定义为1个活性单位(U)。本酶的1 U相当于ATP-PPi交换反应中0.008 Weiss Unit。

纯度

- 2,000 U的本酶和1 µg的λ -Hind III片段或Supercoiled pBR322在37℃下反应24小时，DNA的电泳谱带不发生变化。
- 不含DNA内切酶、外切酶和磷酸酯酶，不含RNA酶，满足常规连接反应要求。

用途

- DNA片段和载体DNA的连接。
- DNA片段和Linker或Adaptor DNA的连接。

使用注意

连接反应因末端碱基顺序的不同而反应速度各异，一般有下列倾向：

突出末端：Hind III>Pst I>EcoR I>BamH I>Sal I

平滑末端：Hae III>Alu I>Hinc II>Sma I

EcoR V>Sca I>Pvu II>Nru I

其中连接Hind III末端的速度约为连接Sal I末端速度的10~40倍；

而连接Hae III末端的速度约为连接Sma I末端速度的5~10倍。

附带10×DNA Ligase Buffer组成（保存：-20℃）

Tris-HCl (pH 7.6) 660 mM

MgCl 66 mM

DTT 100 mM

ATP 1 mM

PEG4000 50%

注意事项:

- 对于普通的转化大肠杆菌的操作，不必对连接产物进行纯化，连接产物可以直接用于转化。但用电转方法转化大肠杆菌时，通常宜先用DNA纯化试剂盒或酚氯仿抽提方法等纯化DNA，然后再进行电转。
- 需进行平端连接或快速连接时，推荐使用本公司**Quick Ligation**。
- 普通的连接反应不必进行凝胶电泳观察。如果需要对于连接产物进行凝胶电泳观察，推荐先在65℃孵育10分钟使T4 DNA Ligase失活，以避免T4 DNA Ligase和DNA结合导致的条带位置迁移(band shift)。

使用举例

DNA片段和载体DNA的连接

1. 在微量离心管中制备下列连接反应液。

10×T4 DNA Ligase Buffer *	2.5 μl
DNA片段**	约0.3 pmol
载体DNA**	约0.03 pmol
T4 DNA Ligase***	1 μl
dH ₂ O	up to 25 μl

* DNA片段的摩尔数应控制在载体DNA摩尔数的3~10倍。

** 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。

*** Buffer与T4酶比较粘稠，吸取时管尖不要深入液面，防止管尖粘附太多液体

2. 20-25℃孵育连接1-2小时，或4℃~16℃过夜反应孵育连接过夜。

注意：为快速获得预期克隆可以参考如下方法：对于25μl的粘端连接反应，在连接1-2小时后可以取10μl直接转化大肠杆菌，其余15μl可以4℃~16℃孵育连接过夜。如果第二天顺利获得克隆，即可进入下一步实验；如果第二天转化的大肠杆菌未获得预期的克隆，则可以取连接过夜的剩余连接产物再次转化大肠杆菌。

3. 随后即可直接取连接产物用于转化感受态细菌

T4 DNA Ligase

货号	产品名称	规格	备注
Cat: TE011	T4 DNA Ligase	50000U/100ul	
	10X T4 DNA Ligase Buffer	1ml	

贮存条件：

低温运输：-20℃贮存，有效期3年。

生产日期：见包装