

T4 DNA 快速连接酶

货号: T1411

规格: 200U/1KU

保存: -20℃保存, 有效期年。

产品组成:

组分	200U	1KU
T4 DNA Ligase(Fast)	200 µl (5 U/µl)	100 µl (30 U/µl)
10× T4 DNA Ligase Buffer	2×1 ml	2×1 ml
50% PEG	1 ml	1 ml

注: 1 U=1 Weiss unit

产品说明:

T4 DNA 快速连接酶由携带 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 快速连接酶需要 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。

酶活单位定义

37℃条件下, 1 Weiss unit 的酶在 20 min 内催化 1 nmol 的 [32PPi] 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℃条件下, 30 min 内连接 50% HindIII 消化后的λDNA 片段。

酶活检测条件

酶活在如下反应混合物中进行测试: 66 mM Tris-HCl (pH 7.6), 6.6 mM MgCl₂, 66 µM ATP, 10 mM DTT, 3.3 µM [32PPi]。

质量控制

核酸内切酶残留检测

37℃条件下, 将 200 U 的 T4 DNA Ligase(Fast)与 1 µg 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℃温育 16 h, 通过 DNA 电泳检测双链 DNA 底物无变化。

蓝白斑测试

室温条件下, 使用 30 U T4 DNA Ligase(Fast)连接 pUC57 DNA/HindIII, pUC57 DNA/PstI 或 pUC57 DNA/SmaI 消化产物 1 h, 然后用 E.coli XL1-Blue 感受态细胞转化连接产物, 检测到少于 1%的白斑。



使用说明：

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	使用量
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 μ l
T4 DNA Ligase(Fast)	1 U
Nuclease-Free Water	To 20 μ l

② 充分混匀并瞬离，22℃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 电转感受态细胞的转化。

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：

试剂	使用量
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 μ l
50% PEG	2 μ l
T4 DNA Ligase(Fast)	5 U
Nuclease-Free Water	To 20 μ l

② 充分混匀并瞬离，22℃温育 1 h；

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 电转感受态细胞的转化。

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	使用量
线性化 DNA	10~50 ng
10×T4 DNA Ligase Buffer	5 μ l
T4 DNA Ligase(Fast)	5 U
Nuclease-Free Water	To 50 μ l

② 彻底混匀并瞬离，22℃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 电转感受态细胞的转化。

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	使用量
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(Fast)	2 U
Nuclease-Free Water	To 20 µl

② 彻底混匀并瞬离，22℃温育 10 min；

③ 在 65℃作用 10 min 或者 70℃作用 5 min，进行热失活。

注意事项：

1. T4 DNA Ligase(Fast) 在浓度高于 200 mM 的 NaCl 或 KCl 中会被强烈抑制；
2. 连接反应液添加量不应该超过感受态细胞体积的 10%，不推荐体系中加入过量的 T4 DNA Ligase(Fast)；
3. 与 T4 DNA Ligase(Fast) 结合的 DNA 可能会在琼脂糖凝胶中出现带移或弥散，为了避免此现象，可以在上样前对酶进行热失活，必要时加入适量的 SDS；
4. 聚乙二醇(PEG)能极大地提高平末端连接的连接效率，PEG 8000 的推荐添加量是连接体系的 5% (w/v)；
5. 电转化效率可能通过对 T4 DNA Ligase(Fast)热失活或者使用离心柱或者氯仿抽提纯化 DNA 方式来提高；
6. 转化子数目可通过延长反应时间至 1 h 而增加；
7. 产品信息仅供参考，如有疑问请致电 400-968-6088 咨询；
8. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。请勿存放于普通住宅区；
9. 为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。

