

E. coli DNA 连接酶

货号：T1430

规格：200U/1KU/5KU

保存：-20℃保存，有效期2年。10X Reaction Buffer 建议长期保存于-80℃，以延长 NAD 半衰期。

产品组成：

组分名称	200U	1KU	5KU	保存
E. coli DNA Ligase (10U/μl)	20μL	100μL	500μL	-20℃
10×Reaction buffer	100μL	500μL	2mL	-20℃

产品介绍：

E. coli DNA 连接酶是一种以 NAD⁺ (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)为辅酶，Mg²⁺依赖的，催化双链 DNA 中 5'磷酸和 3'羟基之间形成磷酸二酯键，即催化双链 DNA 粘性末端连接或双链 DNA 中的缺刻修复的 DNA 连接酶。

E. coli DNA 连接酶可催化双链 DNA 相邻粘性末端 5'磷酸和 3'羟基磷酸二酯键的形成，但常规条件下不能进行平末端双链 DNA 的连接。在添加 10-15% PEG 和适当高浓度的单价阳离子时，也可以催化平末端双链 DNA 的连接反应。E. coli DNA 连接酶在一定温度范围内(4-37℃)均具有活性，同时可以被热失活(65℃ 孵育 20 分钟)。

E. coli DNA 连接酶连接粘性末端双链线性 DNA 的效果请参考图 1：

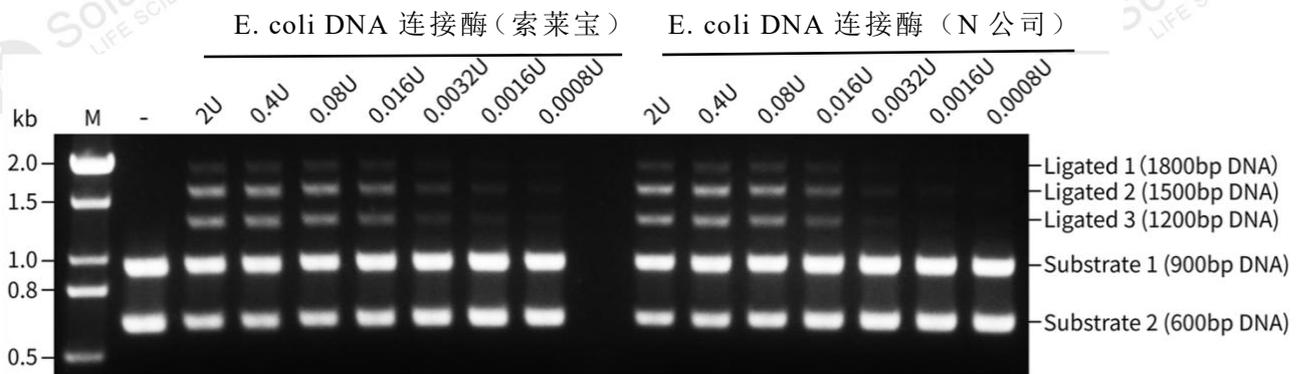


图 1. E. coli DNA 连接酶连接粘性末端双链线性 DNA 的效果图。首先用两端带有 Hind III 酶切位点的引物对靶基因进行 PCR 扩增，生成两种不同长度的两端带有 HindIII 酶切位点的平末端双链线性 DNA 分子(900bp 和 600bp)，随后 Hind III 对 PCR 产物进行酶切，获得两端带有互补粘性末端的双链线性 DNA 分子，分别作为 Substrate 1 (900bp)和 Substrate 2 (600bp)；在 20μl 反应体系(30mM Tris-HCl, 4mM MgCl₂, 1mM DTT, 26μM NAD, 50μg/ml BSA, PH8.0, 25℃)中，分别加入 400ng 经 PCR 扩增及 Hind III 酶切产生的两种双链 DNA 片段，以及图中指定量的本产品或 N 公司(Competitor)的 E. coli DNA 连接酶，16℃ 孵育 30 分钟进行连接，然后 65℃ 孵育 20 分钟以终止反应。取出 10μl 反应产物，加入 2μl 6X DNA Loading Buffer，然后进行 2%琼脂糖凝胶电泳检测。如图所示，本产品与 N 公司的产品相比，具有相当的连接粘性末端双链线





性 DNA 的效果。实际操作时不同实验条件获得的实验结果会略有差异，图中所示结果仅供参考。

用途：粘性末端双链 DNA 分子的连接；双链 DNA 的缺刻修复；cDNA 第二链合成后的克隆。

来源：纯化自携带编码 E. coli DNA 连接酶的 E. coli 重组菌株。

活性定义：One unit is defined as the amount of enzyme required to give 50% ligation of HindIII fragments of λ DNA (5' DNA termini concentration of 0.12 μ M, 300 μ g/ml) in a total reaction volume of 20 μ l in 30 minutes at 16°C in 1X E. coli DNA Ligase Reaction Buffer。

纯度：不含除 E. coli DNA 连接酶之外的其它种类的 DNA 连接酶，不含内切酶和外切酶，不含 RNA 酶，不含磷酸酯酶。

酶储存液：10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 200 μ g/ml BSA, 50% Glycerol (pH7.4, 25°C)。

10X Reaction Buffer：300mM Tris-HCl, 40mM MgCl₂, 260 μ M NAD, 10mM DTT, 500 μ g/ml BSA (pH8.0, 25°C)。

失活或抑制：65°C 孵育 20 分钟可使 E. coli DNA 连接酶失活。

操作步骤：(仅供参考)

1. 参考下表在冰上配置相关反应体系(以 20 μ l 体系为例)：

Reagent	Volume	Final Concentration
dsDNA	X μ L	up to 0.25 μ g/ μ l
10X Reaction Buffer	2 μ L	1X
E. coli DNA Ligase(10U/ μ l)	1 μ L	0.5U/ μ l
Nuclease-free Water	(17-x) μ l	
Total Volume	20 μ L	

注 1：如果同时进行多个反应，可把上表中除底物 DNA 之外的所有组分预先混合，然后再分装到各反应管。

注 2：E. coli DNA 连接酶使用时宜存放在冰盒内或冰浴上。

2. 轻轻震荡混匀或移液器反复吹打混匀，随后低速离心以使粘附在管壁上的液体沉淀至管底。

3. 反应条件：16°C 孵育 30-60 分钟。

4. 终止反应：反应结束后立即将反应产物在 65°C 条件下孵育 20 分钟，以终止反应。

5. 将反应后的产物进行琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺电泳，拍照观察并分析连接效果。如果需从琼脂糖凝胶中回收 DNA 样品，推荐使用 DNA 凝胶回收试剂盒；如果需从酶切消化反应体系中纯化 DNA 样品，推荐使用 PCR 纯化试剂盒/DNA 纯化试剂盒。

6. 其他用途请自行参考 E. coli DNA Ligase 的相关文献资料进行。

注意事项：

1. E. coli DNA 连接酶需要以 NAD (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)作为辅酶，而不是像 T4 DNA 连接酶等以 ATP 为辅酶。

2. E. coli DNA 连接酶对于平末端片段的连接效率是极低的，对于平末端的连接建议使用 T4 DNA Ligase。

3. E. coli DNA 连接酶的催化底物是双链 DNA 分子，不能用于单链 DNA 或 RNA 的连接反应。



4. E. coli DNA 连接酶连接反应需要以 NAD 作为辅助因子，10X Reaction Buffer 中含有辅助因子 NAD，因此 10X Reaction Buffer 建议长期保存于-80° C，以延长 NAD 半衰期。

5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

常见问题：

1. E. coli DNA 连接酶和 T4 DNA Ligase 有什么区别？

在推荐的使用条件下，E. coli DNA 连接酶不能连接平末端 DNA 或 RNA 分子。

2. E. coli DNA 连接酶能否被热失活？

可以。将 E. coli DNA 连接酶在 65°C 条件下孵育 20 分钟，即可使其完全失活。

3. 应该选用哪种连接酶或连接试剂盒？

如果需要平末端或粘性末端的快速连接，建议使用快速 DNA 连接试剂盒。T4 DNA Ligase 是大多数 DNA 重组反应所选用的酶，可用于粘性末端(室温 10 分钟连接)或平末端(室温 2 小时或过夜)的连接。E. coli DNA 连接酶对底物的选择比 T4 DNA Ligase 更具有特异性，如果只需要粘性末端的连接，抑制平末端或 RNA 分子的连接，建议使用 E. coli DNA 连接酶。如果实验目的是单链 DNA 或 RNA 分子的连接，建议使用 T4 RNA Ligase。

