

T4 DNA Ligase(Fast)

货号: T5205-200U

储存条件: -20℃

产品组成

组分	规格
T4 DNA Ligase(Fast) (5U/u1)	40u1
10×T4 DNA Ligase Buffer	1ml
50% PEG	1ml

注: 1U=1 Weiss unit=200 CEU

产品简介

T4 DNA Ligase(Fast)由携带 T4 噬菌体 gene30 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、修复双链 DNA 缺刻与线性 DNA 自环化。T4 DNA Ligase(Fast)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 20min 内催化 1nmol 的 [PPi] 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, 30min 内连接 50% HindIII 消化后的 λ DNA 片段。

酶活检测条件

酶活在如下反应混合物中进行测试: 66mM Tris-HCl(pH7.6), 6.6mM MgCl₂, 0.066mM ATP, 10mM DTT, 3.3 μM [³²P]PPi。

质量控制

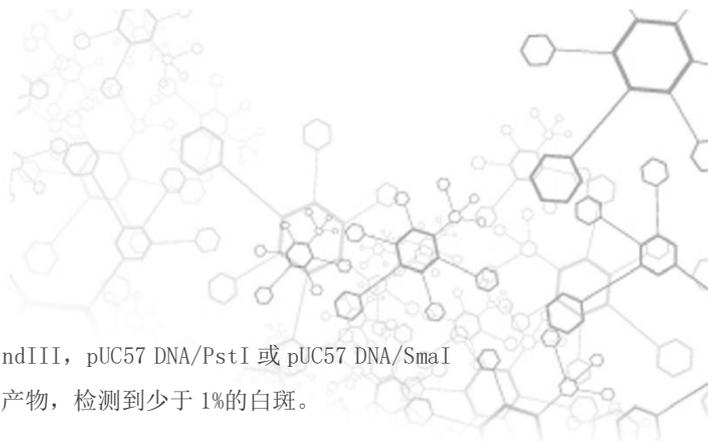
核酸量内控切酶制残留测试

37℃条件下, 将 200U 的 T4 DNA Ligase(Fast)与 1ug 的 pUC19DNA 中温育 4h, 未检测出共价闭合环状 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 16h, 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 30U T4 DNA Ligase 连接 pUC57 DNA/HindIII, pUC57 DNA/PstI 或 pUC57 DNA/SmaI 消化产物 1h，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。

使用方法

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	20~100ng
插入片段 DNA	3:1~10:1（片段：载体摩尔比）
10×T4 DNA Ligase Buffer	2ul
T4 DNA Ligase(Fast)	1U(0.2ul)
Nuclease-Free Water	To 20ul

2) 充分混匀并瞬离，22℃温育 10min；

3) 取 1~5ul 的连接产物用于 50ul 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2ul 用于 50ul 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：

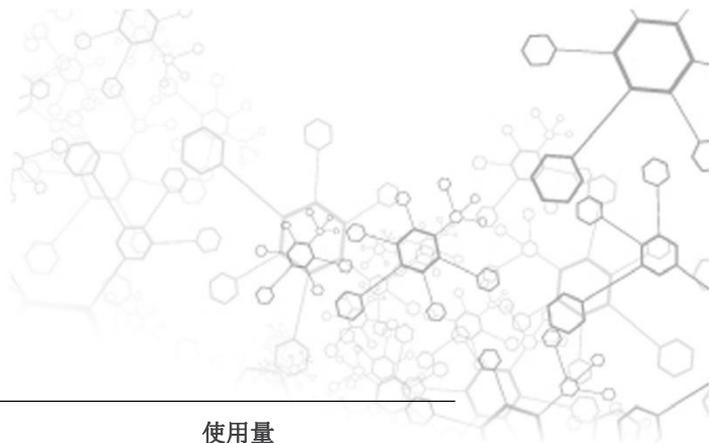
试剂	使用量
线性化载体 DNA	20~100ng
插入片段 DNA	3:1~10:1（片段：载体摩尔比）
10×T4 DNA Ligase Buffer	2ul
50% PEG	2ul
T4 DNA Ligase(Fast)	5U(1ul)
Nuclease-Free Water	To 20ul

2) 充分混匀并瞬离，22℃温育 1h；

3) 取 1~5ul 的连接产物用于 50ul 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2ul 用于 50ul 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	10~50ng
10×T4 DNA Ligase Buffer	5ul
T4 DNA Ligase(Fast)	5U(1ul)
Nuclease-Free Water	To 50ul

2) 彻底混匀并瞬离, 22℃温育 10min;

3) 取 1~5ul 的连接产物用于 50ul 化学感受态细胞的转化, 或者取 1~2ul 用于 50ul 电感受态细胞的转化。

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	100~500ng
磷酸化接头	1~2ug
10×T4 DNA Ligase Buffer	2ul
50% PEG	2ul
T4 DNA Ligase(Fast)	2U(0.4ul)
Nuclease-Free Water	To 20ul

2) 彻底混匀并瞬离, 22℃温育 10min;

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

⚠ 注: 添加 1mM ATP 的条件下, T4 DNA Ligase(Fast)在 LabFD™酶切缓冲液中具有 100%活性。因此, 接头连接反应时可以在 LabFD™酶切缓冲液中进行, 以简化“接头连接-酶切”实验流程。具体方法为: 接头连接反应完成后, 先失活 T4 DNA Ligase, 然后向该体系中添加 ATP 至终浓度 1mM, 再在体系中加入适量的 LabFD™快速内切酶, 最后使用最适酶切反应温度进行温育即可。





兰博利德 LABLEAD

高新技术企业



注意事项

1. T4 DNA Ligase 在浓度高于 200mM 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;
3. 与 T4 DNA Ligase 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，PEG8000 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 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 1h 而增加。

