

T4 DNA Ligase ultra

货号: T5208

储存条件: -20°C

产品组成

组分	规格
T4 DNA Ligase ultra (5U/ul)	200ul
10×T4 DNA Ligase Buffer	1ml
50% PEG	1ml

注: Buffer 融化时, 出现少量沉淀属正常现象, 请待溶液恢复至室温, 震荡混匀后使用。

注: 1U=1 Weiss unit

产品简介

T4 DNA Ligase ultra 是 T4 DNA Ligase 的耐热突变体, 催化双链 DNA 或 RNA 之间的 5'-磷酸基团和 3'-羟基之间形成磷酸二酯键, 与 T4 DNA Ligase 相比大幅度提高了热稳定性, 最高可耐受至 50°C, 从而提高了它在 Golden Gate Assembly 中的连接效率。T4 DNA Ligase ultra 不仅能够连接平末端和粘性末端, 还可以修补双链 DNA 和一些 DNA/RNA 杂交链中的单链切口。与 T4 DNA Ligase 一致, T4 DNA Ligase ultra 也需要 ATP 作为辅助因子。

酶活单位定义

37°C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°C 条件下, 30min 内连接 50% HindIII 消化后的 λDNA 片段。

失活条件

65°C, 10 min。

产品应用

1. 酶切克隆;
2. NGS 测序;
3. dsDNA 或 DNA/RNA 杂合体中的单链缺口修复。

质量控制

蛋白纯度

经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 蛋白纯度不低于 95%。

非特异性内切酶活性

37°C下, 在 20 μl 反应体系中将 5 U T4 DNA Ligase ultra 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 少于 20% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

DNase 活性

37°C下, 在 20 μl 反应体系中将 5 U T4 DNA Ligase ultra 与 15 ng 双链 DNA 片段共同温育 16 h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 双链 DNA 片段无变化。

RNase 活性

37°C下, 在 10 μl 反应体系中将 5 U T4 DNA Ligase ultra 与 500 ng RNA 共同温育 1 h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 超过 90% 的 RNA 保持完整。

蓝白斑测试

22°C 条件下, 使用 5 U T4 DNA Ligase ultra 连接 pUC19 DNA/HindIII, pUC19 DNA/PstI, pUC19 DNA/SmaI 消化产物 1 h, 然后用 Mach1-T1 E. coli 感受态细胞转化连接产物, 检测到少于 1% 的白斑。

宿主 DNA 残留

采用中国药典 2025 版四部通则 3407 外源性 DNA 残留量测定法第三法定量 PCR 法, 本品中大肠杆菌宿主细胞 DNA 残留量不超过 1 拷贝/5 U。

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 ultra	1U(0.2ul)
Nuclease-FreeWater	To 20ul

2) 充分混匀并瞬离, 22°C 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 ultra	5U(1ul)
Nuclease-Free Water	To 20ul

2) 充分混匀并瞬离，22°C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。

注意事项

1. 虽然本产品可耐受高温至 50°C，但不推荐在高温进行常规的酶切连接反应，会由于 DNA 末端无法充分互补配对导致连接效率大幅度下降。
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 ultra；
3. 与 T4 DNA Ligase ultra 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 ultra 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。

