

T4 DNA Ligase, HC

使用说明书

货号/规格: E1014-D/5,000 Weiss U

浓度: 30 Weiss U/ μ L

产品简介

T4 DNA Ligase 催化双链 DNA 或 RNA 中并列的 5'-磷酸和 3'-羟基末端之间形成磷酸二酯键。该酶可修复双链 DNA、RNA 或 DNA/RNA 杂交体中的单链缺口, 将 DNA 片段与粘性末端或平末端连接结合, 但对单链核酸无活性。

T4 DNA 连接酶需要 ATP 作为辅因子。

产品组成

组分	E1014-D
T4 DNA Ligase, HC (30 Weiss U/ μ L)	167 μ L
10X T4 DNA Ligase Buffer	1.5 mL \times 5
50% PEG	1.5 mL \times 5

储存条件

保存于-20°C。

来源

重组 *E. coli* 菌株, 含有从噬菌体 T4 克隆的基因 30。

单位定义

1 个 Weiss 单位是指在 37°C 下 20 分钟内催化 1 nmol 的 [32 P]PPi 转化为可吸附形式所需的酶量。在以下混合物中测定酶活性:

66 mM Tris-HCl (pH 7.6)、6.6 mM MgCl₂、0.066 mM ATP、10 mM DTT、3.3 μ M [32 P]PPi。

1 个 Weiss 单位相当于大约 200 个粘性末端连接单位 (CEU)。1 个 CEU 是指在特定

条件下 (即在 16°C 下 30 分钟内), 将 λ (lambda) DNA 的 HindIII 片段连接达到 50% 所需的酶量。

适用范围

- 克隆限制性内切酶生成的 DNA 片段
- 克隆 PCR 产物
- 将双链寡核苷酸连接子或接头与 DNA 相连
- 定点突变
- 扩增片段长度多态性 (AFLP)
- 连接酶介导的 RNA 检测
- 双螺旋 DNA、RNA 或 DNA/RNA 杂交体中的缺口修复
- 线性 DNA 的自环化

抑制与失活

- 当 NaCl 或 KCl 的浓度高于 200 mM 时, T4 DNA 连接酶的活性会受到强烈抑制。
- 通过在 65°C 下加热 10 分钟或在 70°C 下加热 5 分钟, T4 DNA 连接酶会失去活性。

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:

Component	Amount
Linear vector DNA	20~100 ng
Insert DNA	1:1~5:1 (molar ratio of Fragment: Vector)
10X T4 DNA Ligase Buffer	2 μ L
T4 DNA Ligase	1 Weiss U
ddH ₂ O	To 20 μ L

② 充分混匀并瞬离, 22°C 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:

- 可以通过以下方式提高电转化效率:

① 在 65°C 下加热 10 分钟或在 70°C 下加热 5 分钟使 T4 DNA 连接酶失活。

② 使用 PCR 纯化试剂盒或氯仿萃取法纯化 DNA。

• 通过将反应时间延长至 1 小时，可以增加转化体的总数。

• 如果在 20 微升的反应混合物中使用了超过 2 个 Weiss 单位的 T4 DNA 连接酶，那么在电转化之前，必须通过离心柱或氯仿萃取法纯化 DNA。

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：

Component	Amount
Linear vector DNA	20~100 ng
Insert DNA	1:1~5:1 (molar ratio of Fragment: Vector)
10X T4 DNA Ligase Buffer	2 μ L
50% PEG	2 μ L
T4 DNA Ligase	5 Weiss U
ddH ₂ O	To 20 μ L

② 充分混匀并瞬离，22°C 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：

Component	Amount
Linear DNA	10~50 ng
10X T4 DNA Ligase Buffer	5 μ L
T4 DNA Ligase	5 Weiss U
ddH ₂ O	To 50 μ L

② 彻底混匀并瞬离，22°C 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：

• 可以通过以下方式提高电转化效率：

① 在 65°C 下加热 10 分钟或在 70°C 下加热 5 分钟使 T4 DNA 连接酶失活。

② 使用 PCR 纯化试剂盒或氯仿萃取法纯化 DNA。

• 通过将反应时间延长至 1 小时，可以增加转化体的总数。

重要提示：

• 聚乙二醇（PEG）能显著提高平末端 DNA 连接的效率。在连接反应混合物中，推荐的 PEG 4000 浓度为 5%（w/v）。

• 在反应混合物中，不要超过推荐的 T4 DNA 连接酶用量。

• T4 DNA 连接酶与 DNA 的结合可能导致琼脂糖凝胶中的条带迁移。为避免这种情况，请在加载前将样品与 6× Gel Loading Dye, SDS+ (#M9081) 在 65°C 下孵育 10 分钟，然后在冰上冷却。

• 为了实现高效的转化，连接反应混合物的体积不应超过感受态细胞体积的 10%。

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：

Component	Amount
Linear DNA	100~500 ng
Phosphorylated Linker	1~2 μ g
10X T4 DNA Ligase Buffer	2 μ L
50% PEG	2 μ L
T4 DNA Ligase	2 Weiss U
ddH ₂ O	To 20 μ L

② 彻底混匀并瞬离，22°C 温育 1 h；

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

本品仅供科学研究使用。