

产品组分

组分名称	组分目录号	规格-1	规格-2
		16,000 U	80,000 U
T4 DNA Ligase (400,000 U/mL)	RM21501	40 μ L	200 μ L
10X T4 DNA Ligase Reaction Buffer	RM20108	500 μ L	500 μ L

产品说明

T4 DNA Ligase (T4 DNA 连接酶), 可催化双链 DNA 或 RNA 的 5'-磷酸与 3'-羟基之间形成磷酸二酯键, 该催化反应需 ATP 作为辅助因子。该酶可以催化粘性末端分子间或平末端分子间的连接, 也能修复双链 DNA 或 DNA-RNA 杂交双链上的单链 DNA 切口, 同时 T4 DNA 连接酶会封闭这些 DNA 底物的缝隙。

本品适用于限制性内切酶酶切片段、Linker 或 Adapter 等的连接, 也可以用于切刻修复及 Ligase 介导的 RNA 检测。

保存温度

-20°C

产品来源

T4 噬菌体来源的 T4 DNA Ligase 基因在大肠杆菌中重组表达并经过多步纯化精制而成。

活性定义

1 活性单位(U):指 λ DNA(经 HindIII 酶切, 5' 粘性末端 DNA 浓度 0.12 μ M, 300 μ g/mL)在 20 μ L 体系的 1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer 中, 16°C 反应 30 min, 连接 50% DNA 片段所需的酶量。

反应条件

1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer

1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer组成

50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7.5 @ 25°C

酶储存液

10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, pH 7.4 @ 25°C

热失活

65°C 加热 10 min

操作说明

1、按下表所示在冰上加入各反应组分（以 20 μL 反应体系为例）

组分	使用量
10X T4 DNA Ligase Reaction Buffer*	2 μL
载体 DNA (4 kb)	50 ng (0.02 pmol)
插入 DNA 片段 (1 kb)**	37.5 ng (0.06 pmol)
T4 DNA Ligase***	1 μL
ddH ₂ O	Up to 20 μL

*, 注: 10X T4 DNA Ligase Reaction Buffer 在融解时, 如果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: 连接反应按载体: 插入片段摩尔比为 1: 3 进行。

***, 注: T4 DNA Ligase 应最后加入反应体系中。

2、各反应组分混匀并短暂离心收集溶液到管底。

3、粘性末端底物, 置于 16°C 反应过夜或室温 (20 - 25°C) 连接 10 min。

4、对平末端或单碱基突出末端, 置于 16°C 反应过夜或室温连接 2 h (也可以选择高浓度 T4 DNA Ligase, ABclonal RK21500, 室温反应 10 min 即可完成连接)。

5、(可选) 65°C 加热 10 min 以热失活 T4 DNA 连接酶。

注: 此步骤非必须, 若残留的 T4 DNA 连接酶会影响后续实验, 可以对酶进行热失活处理。

6、将反应产物置于冰上, 取 1-5 μL 连接产物加入到 50 μL 感受态细胞中, 进行转化。