

T4 DNA ligase

目录号: AE1301

使用前请仔细阅读说明书

产品说明

T4 DNA Ligase 即 T4 DNA 连接酶，该酶可以催化粘性末端或者平末端双链 DNA 或 RNA 的 5'-P 末端和 3'-OH 末端之间形成磷酸二酯键，同时 T4 DNA 连接酶可以修补双链 DNA、双链 RNA 或 DNA/RNA 复合物上的单链缺口(single-strand nicks)，但对于单链核酸无活性。T4 DNA Ligase 进行酶连反应时需要 ATP 作为辅助因子。

本公司 T4 DNA 连接酶是重组表达，并经多步纯化制备的重组蛋白

活性定义

在 20 μ l 1 $\times$ T4 DNA 连接酶反应缓冲液中，16 $^{\circ}$ C 反应条件下，30 分钟使 50% 的经 HindIII 消化的 λ DNA 片段 [5' 端浓度为 0.12 μ M (300 μ g/ml)，DNA 总量 6 μ g] 连接所需的酶量，为 1 个单位。

活性测定条件

50 mM Tris-HCl (pH 7.5 @ 25 $^{\circ}$ C)，1 mM ATP，10 mM MgCl₂，10 mM DTT，16 $^{\circ}$ C 温育，推荐 DNA 5'末端浓度为 0.1-1.0 μ M。

浓度: 400U/ μ l

保存条件: -20 $^{\circ}$ C

特点

- 完成粘性末端连接反应仅需 1 分钟；
- 热失活: 65 $^{\circ}$ C 加热 10min。

适用范围

- 限制性内切酶克隆
- 高效连接粘性末端和平末端
- T/A 克隆
- 构建高丰度克隆文库
- RNA 和 DNA 的连接
- 双链 DNA、RNA 或 DNA/RNA 的单链切割修复等

产品包装规格及组成

Component	AE1301A	AE1301B
T4 DNAligase	10kU	50kU
10 $\times$ T4 DNA Ligase Buffer	0.2ml	1.0ml

质量控制

相关测试表明无外源内切、外切脱氧核糖核酸酶、RNase 污染和磷酸酯酶，满足常规连接反应要求。PCR 方法检测无宿主残余 DNA。

酶贮存缓冲液

10 mM Tris-HCl，50 mM KCl，1 mM DTT，0.1 mM EDTA，50% Glycerol，pH 7.4 @ 25 $^{\circ}$ C。

注意事项

- 推荐 DNA 5' 末端浓度为 0.1-1.0 μ M，16-22 $^{\circ}$ C 温育。
- 添加 5-10% PEG4000 或 PEG6000 能够提高平末端 DNA 的连接效率。
- 5 $\times$ Ligase Buffer 含有 ATP，使用前应在室温放置至融化或用手掌温度辅助融化，然后置于冰上。不要加热融化和不宜反复冻融以免 ATP 降解。

- T4 DNA Ligase 对热敏感，容易失活。热失活条件：65°C条件下加热 10 min，或者 70°C 条件下作用5 min 。
- 对于普通的转化大肠杆菌的操作，不必对连接产物进行纯化，连接产物可以直接用于转化。但用电转法转化大肠杆菌时，建议先用 DNA 纯化试剂盒纯化 DNA，然后再进行电转。
- 如果需要对于连接产物进行凝胶电泳观察，可以在上样前对酶进行热失活，以免结合有 T4 DNA Ligase 的 DNA 可能会在琼脂糖凝胶中出现带移或弥散现象。

相关产品

感受态细胞

应用实例

1. 限制性内切酶酶连克隆

1) 按下表配制反应体系

反应组分	体积/ul
10× Buffer	2
载体	50ng
基因片段	50ng-150ng
T4 DNAligase (400U/μl)	1-2
H ₂ O	Variable
总体积	20

2) 如为粘末端连接反应，22°C 连接 5-60min，或 4°C 连接过夜；

3) 连接产物直接用于转化（或冻存于-20°C）。

警告：本产品仅限科研实验使用，临床应用安全性和有效性未鉴定，不可用于医疗临床诊断。