

产品说明

本酶具有以 ATP 作为辅因子,连接与同一互补 DNA 链杂交的相邻寡核苷酸链的 5'磷酸末端和 3'羟基末端从而形成磷酸二酯键的连接酶活性,且必须同时满足两条寡核苷酸与互补 DNA 链完全配对和两链之前没有间隙 (gap) 的条件才能反应。本酶耐热性好,在 45-70℃区间内均有活性。

本公司 9°N DNA ligase 是重组表达,并经多步纯化制备的重组蛋白。

活性定义

1 单位指在温度为 45℃, 1× 9°N DNA ligase Buffer 缓冲体系的反应条件下, 15min 内能连接 50% 的被 BstEII 消化的 1μg λ DNA 片段 (约相当于 0.036pmole 12 bp 粘性末端) 所需的酶量, 粘性末端活性单位相当于切刻封闭单位。

活性测定条件

10 mM Tris-HCl, 600 μM ATP, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 mM DTT, 0.1% Triton X-100 (pH 7.5 @ 25℃), 45℃ 温育。

浓度: 40U/μl

保存条件: -20℃保存

特点

- 耐热性好, 兼容 连接酶链式反应 (ligase chain reaction, LCR) 模板预变性步骤;
- 忠实性极高, 缺口处错配碱基对不会被连接
- 可在高温条件下连接 DNA 链上的切刻位点。
- 与常温 DNA 连接酶相比, 具有更高的连接特异性和较低的非特异性背景。
- 与Taq DNA 连接酶相比, 具有更高的连接特异性和较低的非特异性背景。
- 反应温度范围为 35-70度, 高温下特异性和活性增强, 反应温度可接近 80℃。

适用范围

- 通过连接酶检测反应 (LDR) 和连接酶链式 (LCR) 反应, 检测等位基因特异性
- 连接酶链式反应 (LCR) 中连接磷酸化寡核苷酸
- 高温下连接 DNA 链上的切刻位点

产品包装规格及组成

Component	AE1310A	AE1310B
9°N DNA 连接酶	2000U	10000U
10× 9°N 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。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, 200 μg/ml BSA, 50% Glycerol, 10 mM (NH₄)₂SO₄, pH 7.4 @ 25℃。

注意事项

- 本产品需要辅助因子 ATP 参与反应
- 本产品可有效连接 12 bp 的互补片段, 但无法连接 4 bp 的互补片段 (典型限制酶消化产物)。
- 本产品不能替代 T4 DNA ligase (目录号 AE1301)

相关产品

AE1308: Taq DNA ligase; AE1307: Pfu DNA ligase;

应用实例

1. 连接反应

1) 按下表配制反应体系

反应组分	体积/ul
10× Buffer	2
底物：互补粘性末端>8nt 的 DNA	100ng-1μg
9°N DNA ligase (40U/μl)	1-2
H ₂ O	Variable
总体积	20

2) 45-50°C 连接 15min

3) 对于较长的双链 DNA 底物，琼脂糖电泳检测连接产物；对于短于 100bp 的短片段 DNA，聚丙烯酰胺凝胶电泳检测连接产物。

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。