

T4 DNA Ligase (Fast)

使用说明书

货号/规格: K012-A/1000 U

浓度: 5 U/ μ L

注: 1 U=1 Weiss unit

产品简介

T4 DNA Ligase (Fast)由携带 T4 噬菌体 gene 30 的大肠杆菌产生。该酶催化双螺旋 DNA 或 RNA 之间的 5'-磷酸基团和 3'-羟基之间形成磷酸二酯键。该酶在双链 DNA、RNA 或者 DNA/RNA 复合物间可修复单链缺刻, 并且可以连接有粘性末端或者平末端的 DNA 片段, 但对于单链核酸无活性, 主要用于限制性内切酶酶切产物 DNA 片段克隆、基因定点突变与 PCR 产物克隆、线性 DNA 自环化与修复双链 DNA 缺刻。T4 DNA Ligase (Fast) 需要 ATP 作为辅助因子, 在室温下完成粘性末端连接反应仅需 10 分钟。

产品组成

组分	K012-A (1,000 U)
T4 DNA Ligase (Fast) (5 U/ μ L)	200 μ L
10X T4 DNA Ligase Buffer	1 mL
50% PEG	1 mL

储存条件及有效期

保存于-20 $^{\circ}$ C。

单位定义

37 $^{\circ}$ C条件下, 1 Weiss unit 的酶在 20 min 内催化 1 nmol 的 [32 P]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 $^{\circ}$ C 条件下, 30 min 内连接 50% HindIII 消化后的 λ DNA 片段。

适用范围

1. TA 克隆
2. NGS 接头连接

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	3:1~10:1 (molar ratio of Fragment: Vector)
10X T4 DNA Ligase Buffer	2 μ L
T4 DNA Ligase (Fast) (5 U/ μ L)	1 U (0.2 μ L)
ddH ₂ O	To 20 μ L

② 充分混匀并瞬离, 22 $^{\circ}$ 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: 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:

Component	Amount
Linear vector DNA	20~100 ng
Insert DNA	3:1~10:1 (molar ratio of Fragment: Vector)
10X T4 DNA Ligase Buffer	2 μ L
50% PEG	2 μ L
T4 DNA Ligase (Fast) (5 U/ μ L)	5 U (1 μ L)
ddH ₂ O	To 20 μ L

②充分混匀并瞬离, 22 $^{\circ}$ 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 (Fast) (5 U/ μ L)	5 U (1 μ L)
ddH ₂ O	To 50 μ L

② 彻底混匀并瞬离，22℃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：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。

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 adaptor	1~2 μ g
10X T4 DNA Ligase Buffer	2 μ L
50% PEG	2 μ L
T4 DNA Ligase (Fast) (5 U/ μ L)	2 U (0.4 μ L)
ddH ₂ O	To 20 μ L

② 彻底混匀并瞬离，22℃温育 10 min；

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

注意事项

1. T4 DNA Ligase(Fast) 在浓度高于 200 mM 的 NaCl 或 KCl 中会被强烈抑制；
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(Fast)；
3. 与 T4 DNA Ligase(Fast) 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(Fast) 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。

本品仅供科学研究使用。