

快速 T4 DNA 连接酶说明书

产品组成

快速 T4 DNA 连接酶	5 U(weiss)/ μ l
Cat. No.	8002020
T4 DNA Ligase(Fast)	20 μ l
10 \times T4 DNA Ligase Buffer	100 μ l
50% PEG	100 μ l

产品储存与有效期

- 20 $^{\circ}$ C 保存，有效期为两年。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

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、修复双链 DNA 缺刻与线性 DNA 自环化。T4 DNA Ligase 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。

活性单位定义：

37 $^{\circ}$ C 条件下，1 Weiss unit 的酶在 20 分钟内催化 1 nmol 的 [32 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 分钟内连接 50% Hind III 消化后的 λ DNA 片段。

注意事项：

1. 载体 DNA 和连接片段的摩尔比：对于不同的载体和 DNA 片段，要取得成功的连接，应分别建立具有不同摩尔数比例的连接反应。在大多数情况下，DNA 片段的摩尔数应控制在载体 DNA 摩尔数的 3~10 倍。
2. 平末端的载体与 DNA 片断连接时，应首先对载体进行去磷酸化，以防止载体自身环化。
3. T4 DNA Ligase 在浓度高于 200 mM 的 NaCl 或 KCl 中会被强烈抑制。
4. 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。
5. 与 T4 DNA Ligase 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。
6. 聚乙二醇 (PEG) 能极大地提高平末端连接的连接效率，但 PEG 可能导致 cDNA 片段克隆产物出现串联体并抑制包装反应。PEG 的推荐添加量是连接体系的 5% (w/v)。
7. 电转化效率可通过对 T4 DNA Ligase 热失活或者使用离心柱或者氯仿抽提纯化 DNA 方式来提高。
8. 转化子数目可通过延长反应时间至 1 小时而增加。

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：

连接体系中的成分	使用量
线性化载体 DNA	20~100 ng
插入片段 DNA	3:1~10:1（片段：载体摩尔比）
10×T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
T4 DNA Ligase(Fast)	1 U (0.2 μl)
无菌去离子水	补足到 20 μl

② 充分混匀并稍离，22℃温育 10 分钟；

③ 取 1~5 μl 的连接产物用于 50 μl 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2 μl 用于 50 μl 电感受态细胞的转化。

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：

连接体系中的成分	使用量
线性化载体 DNA	20~100 ng
插入片段 DNA	3:1~10:1（片段：载体摩尔比）
10×T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
50% PEG	2 μl
T4 DNA Ligase(Fast)	5 U (1 μl)
无菌去离子水	补足到 20 μl

② 充分混匀并稍离，22℃温育 1 小时；

③ 取 1~5 μl 的连接产物用于 50 μl 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2 μl 用于 50 μl 电感受态细胞的转化。

3. 线性 DNA 自环化

① 于冰上配制如下反应体系：

连接体系中的成分	使用量
线性化 DNA	10~50 ng
10×T4 DNA Ligase Buffer	5 μl
T4 DNA Ligase(Fast)	5 U (1 μl)
无菌去离子水	补足到 50 μl

② 充分混匀并稍离，22℃温育 10 分钟；

③ 取 1~5 μl 的连接产物用于 50 μl 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2 μl 用于 50 μl 电感受态细胞的转化。

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：

连接体系中的成分	使用量
线性化 DNA	100~500 ng
磷酸化接头	1~2 μg
10×T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
50% PEG	2 μl
T4 DNA Ligase(Fast)	2 U (0.4 μl)
无菌去离子水	补足到 20 μl

② 充分混匀并稍离，22℃温育 10 分钟；

③ 在 70℃作用 5 min，进行热失活。

注：添加 1 mM ATP 的条件下，T4 DNA Ligase(Fast)在 MinuteCut™酶切缓冲液中具有 100%的活力。因此，接头连接反应时可以在 MinuteCut™酶切缓冲液中进行，以简化“接头连接—酶切”实验流程。具体方法为：向接头连接体系中添加 ATP 至终浓度 1 mM，接头连接反应完成后，先失活 T4 DNA Ligase。然后再在体系中加入适量的 MinuteCut™快速内切酶，最后使用最适酶切反应温度进行温育即可。