

T4 DNA 连接酶说明书

产品组成

T4 DNA 连接酶	5U (weiss)/ μ l
Cat. No.	8002020
T4 DNA Ligase	20 μ l
10 \times T4 DNA ligase Buffer	30 μ l

来源：重组大肠杆菌

10 \times T4 DNA ligase Buffer: 400mM Tris-HCl,(pH7.8), 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 5mM ATP。

储存 Buffer: 20 mM Tris.HCl,(pH7.5), 50 M KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % (v/v)甘油。

产品储存与有效期

T4 DNA 连接酶和 10 \times T4 DNA ligase Buffer 必须放置于-20 $^{\circ}$ C 保存，避免反复冻融，10 \times T4 DNAligase Buffer 建议分装使用。

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

本酶在以 ATP 作辅酶的情况下，可以催化相邻 DNA 链的 5' 磷酸基团和 3' 羟基之间的连接反应。平末端和粘性末端均可，此酶也可以催化双链 RNA 与双链 DNA 连接，但不能催化单链核酸的连接。

活性单位定义：

1 个 Weiss 活性单位是指在 ATP-PPi 交换反应中，37 $^{\circ}$ C、20 分钟内将 1nmol [32PPi] 转换为 Norit 可吸收形式所需的酶量。1 个 Weiss 单位相当于约 200 个粘性末端连接单位。

1 个粘性末端连接单位：20 μ l 反应体系(50 mM Tris-HClpH7.5), 10 mM MgCl₂, 10mM DTT, 1 mM ATP, 25 μ g/ml BSA, 0.12 μ M (300 μ g/ml)的 5' DNA 末端)中，在 16 $^{\circ}$ C、30 分钟内 50%连接 HindIII 酶切的 Lambda DNA 产物所需要的酶量。

使用示例

1. 先将 10×T4 DNA ligase Buffer 在冰上融化，并进行短暂的离心。
2. 以 10 μ l 连接体系为例，在微量离心管中加入以下各种成分：

连接体系中的成分	反应体系
目的 DNA 片段	约 0.1 μ mol
载体 DNA	约 0.01 μ mol
10×T4 DNA ligase Buffer	1 μ l
T4 DNA Ligase	0.5-1 μ l
无菌去离子水	补足到 10 μ l

3. 22 $^{\circ}$ C 温育 10 min。
4. 将 3-5 μ l 连接产物转化至 100 μ l 感受态细胞中。

注意：

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. 如果向连接反应体系中加入 PEG 可以促进钝末端的连接，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。