

版本号: M16B01V1.0



E. coli DNA Ligase

TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

目录号: RK20501

规格: 200 U / 1,000 U

浓度: 10,000 U/mL

产品组成:

<i>E. coli</i> DNA Ligase (10,000 U/mL)	RM20505
10X <i>E. coli</i> DNA Ligase Reaction Buffer	RM20128

产品说明

E. coli DNA Ligase 催化相邻粘性末端 DNA 链的 5'-磷酸基与 3'-羟基形成磷酸二酯键, 且对平末端的底物 DNA 无明显连接活性。*E. coli* DNA Ligase 以 NAD⁺ 作为辅助因子, 可以被热失活, 且在 4-37°C 的温度范围内都有连接活性。

产品来源

E. coli DNA Ligase 基因在大肠杆菌中重组表达并纯化获得。

活性定义

1 活性单位(U)指λ DNA (经 HindIII 酶切, 具有 5' 粘性末端, DNA 浓度 0.12 μM, 300 μg/mL) 在 20 μL 体系的 1X *E. coli* DNA Ligase Reaction Buffer 中, 16°C 反应 30 min, 连接 50% DNA 片段所需的酶量。

反应条件

1X *E. coli* DNA Ligase Reaction Buffer, 16°C 反应

1X *E. coli* DNA Ligase Reaction Buffer 组成

30 mM Tris-HCl, 4 mM MgCl₂, 26 μM NAD⁺, 1 mM DTT, 50 μg/mL BSA, pH 8 @ 25°C

保存温度

E. coli DNA Ligase 长期保存: -20°C

10X Reaction Buffer 短期保存: -20°C, 长期保存: -80°C

酶存储液

10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 200 μg/mL BSA, 50 % Glycerol, pH 7.4 @25°C

热失活

65°C 加热 20 min

操作说明

1. 按下表所示加入各反应组分:

推荐的反应体系(以 20 μL 体系为例)

组分	加入量
ddH ₂ O	Up to 20 μL
10X <i>E. coli</i> DNA Ligase Reaction Buffer	2 μL
DNA	Up to 5 μg
<i>E. coli</i> DNA Ligase	1 μL (10 U)

2. 将上述反应体系吹打混匀并瞬时离心后置于 16°C 反应 30 min。

3. 65°C 加热 20 min 使连接酶热失活。

注意事项

- 相比其他许多连接酶以 ATP 为辅助因子, *E. coli* DNA Ligase 是以 NAD⁺ (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 作为辅助因子。
- 使用 *E. coli* DNA Ligase 连接平末端 DNA 片段效率极低, 若是对平末端 DNA 片段的连接, 可以使用 T4 DNA 连接酶。
- E. coli* DNA Ligase 不能完成 RNA 与 DNA 分子间的连接。
- E. coli* DNA Ligase 仅能连接粘性末端 DNA 片段。
- E. coli* DNA Ligase 连接反应需要 NAD⁺ 作为辅助因子, 10X Ligase Reaction Buffer 中含有辅助因子 NAD⁺, 所以 10X Ligase Reaction Buffer 应长期置于 -80°C 保存, 以延长 NAD⁺ 的半衰期。

质量控制

- ◆ SDS-PAGE 检测蛋白纯度大于 95%。
- ◆ 无核酸内切酶、单链 DNA 酶和 RNA 酶活性。
- ◆ PCR 检测无宿主基因组残留。