

产品组分

组分名称	组分目录号	规格-1	规格-2
		100,000 U	750,000 U
T7 DNA Ligase	RM20539	34 μ L	250 μ L
2X Universal DNA Ligase Buffer	RM20807	1 mL	1mL $\times$ 3

产品说明

T7 DNA Ligase (T7 DNA 连接酶)是一种来自噬菌体 T7 的 ATP 依赖性 ds DNA 连接酶, 它将催化相邻的 5'磷酸盐和 3'羟基双链 DNA 之间磷酸二酯键的形成, 可以连接粘性末端和 ds DNA 缺刻的连接, 不能催化平末端 DNA 连接, 使其成为仅需连接粘性末端应用的不错选择。

产品来源

T7 噬菌体来源的 T7 DNA Ligase 基因在大肠杆菌中重组表达并经过分离纯化获得。

活性定义

1 活性单位 (U) 指 HindIII 酶切的 λ DNA 片段 100ng, 具有 5' 粘性末端, 在 20 μ L 体系的 1X Universal DNA Ligase Buffer 中, 25°C 反应 30 min, 连接 50% DNA 片段所需的酶量。

酶存储液

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

保存温度

-20°C

反应条件

1X Universal DNA Ligase Buffer, 25°C

1X Universal DNA Ligase Buffer 组成

66 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 7.5% Polyethylene glycol (PEG 6000), pH 7.6 @ 25°C

热失活

否

操作说明

1. 按下表所示在冰上加入各反应组分 (以 20 μ L 反应体系为例) :

组分	用量
2X Universal DNA Ligase Buffer *	10 μ L
载体 DNA (4 kb)	50 ng (0.02 pmol)
插入 DNA 片段 (1 kb) **	37.5 ng (0.06 pmol)
T7 DNA Ligase ***	1 μ L
Nuclease-free water	Up to 20 μ L

注 1: *, 2X Universal DNA Ligase Buffer 在融解时, 如果出现少量沉淀属正常现象, 请待溶液恢复至室温, 震荡混匀后使用。

注 2: **, 连接反应按载体: 插入片段摩尔比为 1: 3 进行。

注 3: ***, T7 DNA Ligase 应最后加入反应体系中。

2. 各反应组分混匀并短暂离心收集溶液到管底;

3. 置于 25°C 反应 15~30 min;

注: 由于反应体系中含有 PEG 6000, 因此 T7 DNA Ligase 不能进行热失活, 否则会显著降低后续的转化效率。

4. 将反应产物置于冰上，取 1-5 μL 连接产物加入到 50 μL 感受态细胞中，进行转化及后续实验。

质量控制

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