

产品组分

组分名称	组分目录号	规格-1	规格-2
		20,000 U	100,000 U
High Salt-T4 DNA Ligase (400,000 U/mL)	RM21511	50 μ L	250 μ L
10X T4 DNA Ligase Reaction Buffer	RM20108	500 μ L	500 μ L

产品说明

High Salt-T4 DNA Ligase 是 T4 DNA 连接酶的耐盐突变体，可催化双链 DNA 或 RNA 的 5'-磷酸基团与 3'-羟基之间形成磷酸二酯键，在比野生型 T4 DNA 连接酶更高的盐浓度下起作用。该催化反应需 ATP 作为辅助因子，High Salt-T4 DNA Ligase 在盐浓度高达 300 mM 时仍可催化粘性末端分子间或平末端分子间的连接，也能修复双链 DNA 或 DNA-RNA 杂交双链上的单链 DNA 切口，同时 T4 DNA 连接酶会封闭这些 DNA 底物的缝隙。

产品来源

T4 噬菌体来源的 T4 DNA Ligase 基因在大肠杆菌中重组表达并经过多步纯化精制而成。

活性定义

1 活性单位 (U) 指 λ DNA (经 HindIII 酶切, 5'粘性末端 DNA 浓度 0.12 μ M, 300 μ g/mL) 在 20 μ L 体系的 1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer 中, 16°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 T4 DNA Ligase Reaction Buffer

1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer 组成

50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7.5 @ 25°C

热失活

65°C 加热 10 min

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
10X T4 DNA Ligase Reaction Buffer*	2 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)
High Salt-T4 DNA Ligase ***	1 μ L
ddH ₂ O	Up to 20 μ L

注 1: *, 10X T4 DNA Ligase Reaction 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: ***, High Salt-T4 DNA Ligase 应最后加入反应体系中。在 NaCl 浓度达 300 mM 时仍保持接近 100%活性, 在 NaCl 浓度达 450 mM 时仍保持 50%左右活性。

2. 各反应组分混匀并短暂离心收集溶液到管底;
3. 置于 16°C 反应过夜或室温连接 10 min;
4. (可选) 65°C 加热 10 min 以热失活 High Salt-T4 DNA Ligase;

注: 此步骤非必须, 如果残留的 High Salt-T4 DNA Ligase 会影响后续实验, 可以对酶进行热失活处理。

5. 将反应产物置于冰上, 取 1-5 μ L 连接产物加入到 50 μ L 感受态细胞中, 进行转化。

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。