



中科瑞泰（北京）生物科技有限公司

Tel: 010-82598075

Fax: 010-82597807

<http://www.real-tims.com.cn>

E-mail: real-times@vip.163.com

T4 连接酶 T4 DNA ligase

说明书 Ver 630872-1

货号: RTT2101

● 产品组成:

名称	规格
T4 DNA ligase (5U/μl)	100 U (20μl)
10×T4 DNA Ligation Buffer	0.2 ml
50%PEG Solution	0.15 ml

● 保存: -20℃

● 产品简介:

T4 DNA Ligase 是从表达 T4 DNA Ligase 基因的大肠杆菌经诱导表达后分离纯化而来的,催化相邻 DNA 链的 5'磷酸基团和 3'羟基基团以磷酸二酯键结合反应。该酶可催化平末端或粘性末端 DNA 之间的连接,还可修复双链 DNA、RNA、DNA/RNA 杂交双链中的单链切口。本品可应用于 DNA 插入片段和载体 DNA 的粘性末端和平末端的连接,以及线性 DNA 的自身环化。

活性定义: 此酶的活力单位为 Weiss Unit。1 个 Weiss Unit 相当于约 200 个粘性末端连接单位 (cohesive-end ligation unit, CEU)。1 个 CEU 单位定义为在 20 μl 的连接反应体系中,在 16℃30 分钟内,能使 50%的经 HindIII 消化的 λDNA 片段连接所需的酶量。

● 注意事项

1. T4 DNA Ligase 的最终用量不要超过推荐的用量,否则影响连接效率。
2. PEG 可以极大提高平末端的连接效率,我们推荐加入终浓度为 5% PEG Solution 以提高平末端的连接效率。
3. 为了提高转化效率,转化时建议所加入连接产物的量不要超过感受态细胞体积的 10%。
4. 由于 T4 DNA Ligase 中含有甘油,比较粘稠容易挂壁,建议使用前短暂离心将液体收集到管底,取样时枪头尽量不要深入液面太深以免粘在枪头上造成损失。

● 使用方法:

一 DNA 片段和载体 DNA 的连接

1) 粘性末端的连接

1. 反应体系:

	10 μ l 体系	终浓度
线性载体 DNA	x μ l	10-50 ng
插入 DNA 片段	y μ l	插入片段: 载体=1:1-5:1*
10 \times ligation buffer	1 μ l	1 \times
T4 DNA ligase(5U/ μ l)	0.1 μ l	0.5 U
ddH ₂ O	up to 10 μ l	

*: 载体与插入片段的摩尔数比需要优化: 一般 vector:insert 在 1:1~1:5 之间均可得到较好的结果。用以下公式计算片段摩尔数: pmol 数= DNA 量(ng)/(660 \times 片段 bp 数) \times 1000。例如: 插入片段 2000bp, 线性载体为 3000bp, 如果载体使用量为 50ng (0.025pmol), 10 μ l 连接体系中 vector:insert 的摩尔比是 1:3, 则需要 2000bp pmol 数为 0.075pmol, 插入片段 2000bp 的使用量为 100ng。

- 彻底轻柔混匀后, 瞬间离心, 将管壁上的溶液收集到管底。
- 反应条件: 16 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。
- 可取 5 μ l 连接产物热击转化 50 μ l 感受态细胞或取 1-2 μ l 连接产物电击转化 50 μ l 感受态细胞。

注: 1) 若要提高电转实验效率, 推荐 65 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟或 70 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟以灭活 T4 DNA Ligase 后, 用 DNA 产物纯化试剂盒对连接后的 DNA 片段进行纯化后进行电击转化。

2) 若要提高转化子数目, 可将连接时间延长至 1 小时。

3) 在 10 μ l 连接体系中若 T4 连接酶的终浓度大于 1 U, 必须对连接后的 DNA 片段进行纯化后方可进行电转。

2) 平末端的连接

1. 反应体系:

	10 μ l 体系	终浓度
线性平末端载体 DNA*	x μ l	10-50 ng
插入 DNA 片段	y μ l	插入片段: 载体=1:1-5:1**
10 \times ligation buffer	1 μ l	1 \times
T4 DNA ligase(5U/ μ l)	0.5 μ l	2.5 U
50% PEG solution	1 μ l	5%
ddH ₂ O	up to 10 μ l	

*: 平滑末端的载体与 DNA 片段进行连接时, 应首先将载体进行去磷酸化处理, 以防止其自身环化。

** : 载体与插入片段的摩尔数比需要优化: 一般 vector:insert 在 1:1~1:5 之间均可得到较好的结果。用以下公式计算片段摩尔数: pmol 数= DNA 量(ng)/(660 \times 片段 bp 数) \times 1000。例如: 插入片段 2000bp, 线性载体为 3000bp, 如果载体使用量为 50ng (0.025pmol), 10 μ l 连接体系中 vector:insert 的摩尔比是 1:3, 则需要 2000bp pmol 数为 0.075pmol, 插入片段 2000bp 的使用量为 100ng。

- 彻底轻柔混匀后, 瞬间离心, 将管壁上的溶液收集到管底。

3. 反应条件：16℃ 孵育 30 分钟。

4. 可取 5 μl 连接产物热击转化 50 μl 感受态细胞或取 1-2 μl 连接产物电击转化 50 μl 感受态细胞。

注：1) 由于平末端连接体系中，T4 ligase 用量较大，若要提高电转实验效率，推荐 65℃ 孵育 10 分钟或 70℃ 孵育 5 分钟以灭活 T4 DNA Ligase 后，用 DNA 产物纯化试剂盒或氯仿抽提对连接后的 DNA 片段进行纯化后才能进行电击转化。

2) 若要提高转化子数目，可将连接时间延长至 1 小时。

二 线性 DNA 的自身环化

1. 反应体系:

	50μl 体系	终浓度
线性载体 DNA	x μl	10-50 ng
10×ligation buffer	5 μl	1×
T4 DNA ligase(5U/μl)	1 μl	5 U
ddH ₂ O	up to 50 μl	

2. 彻底轻柔混匀后，瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底。

3. 反应条件：16℃ 孵育 30 分钟。

4. 可取 5 μl 连接产物热击转化 50 μl 感受态细胞或取 1-2 μl 连接产物电击转化 50 μl 感受态细胞。

注：1) 若要提高电转实验效率，推荐 65℃ 孵育 10 分钟或 70℃ 孵育 5 分钟灭活 T4 DNA Ligase 后，用 DNA 产物纯化试剂盒或氯仿抽提对连接后的 DNA 片段进行纯化后才能进行电击转化。

三 接头连接

1. 反应体系:

	20μl 体系	终浓度
线性 DNA	x μl	100-500 ng
磷酸化接头	y μl	1-2 μg
10×ligation buffer	2 μl	1×
50% PEG solution	2 μl	5%
T4 DNA ligase(5U/μl)	0.4 μl	2 U
ddH ₂ O	up to 20 μl	

2. 彻底轻柔混匀后，瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底。

3. 反应条件：16℃ 孵育 30 分钟。

4. 65℃ 孵育 10 分钟或 70℃ 孵育 5 分钟灭活 T4 DNA Ligase。连接产物可以直接进行限制性内切酶酶切反应。