

T4 DNA Ligase

使用说明书

【目录号】

HRK-CC302-01

HRK-CC302-02

【组分说明】

试剂成分	25000U	100000U
T4 DNA Ligase (500000U/ml)	50 μ l	200 μ l
10 \times T4 DNA Ligase Buffer	200 μ l	500 μ l

【产品描述】

T4 DNA 连接酶可以催化双链 DNA 或 RNA 中相邻的 5' 磷酸酯和 3' 羟基末端之间的磷酸二酯键的形成。该酶可以连接平末端和粘性末端，并修复双链 DNA 或 DNA/RNA 杂合物上的单链缺口。可用于克隆、扩增片段长度多态性 (AFLP) 等实验。

【产品来源】

具有 T4 DNA 连接基因的大肠杆菌菌株。

【活性单位】

一个活性单位是指 20 μ l 体系下，16 $^{\circ}$ C 连接 20 分钟，50% 以上的 λ DNA 的 HindIII 片段（终浓度为 0.12 μ M，300 μ g/ml）被连接所需要的酶量定义为 1 个单位。

【存储条件】

- 10mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% 甘油, pH7.5 @ 25 $^{\circ}$ C;
- 存储温度: -20 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C。
- 失活温度: 65 $^{\circ}$ C, 10 分钟。

【使用说明】

质粒载体构建 (20 μ l 体系为例):

- (1) 向 200 μ l PCR 管中加入以下试剂 (冰上操作):

成分	加入量
10 \times T4 DNA Ligase Buffer *	2 μ l
载体 DNA (4kb)	50 ng (0.02 pmol)
插入 DNA (1kb) **	37.5 ng (0.06 pmol)
T4 DNA Ligase ***	1 μ l
ddH2O	加水至 20 μ l

*10 \times T4 DNA 连接 buffer 需要在室温溶解完全振荡混匀后再使用。

**待插入 DNA (1KB) 片段: 载体的摩尔比为 1: 3。

***T4 DNA 连接酶需要最后加入。

- (2) 用枪头将上述溶液轻轻吹吸混匀，短暂离心，使所有组分收集到管底。

- (3) 执行以下程序:

1) 对于粘性末端 DNA，反应条件为 16 $^{\circ}$ C 过夜或者室温 (20-25 $^{\circ}$ C) 10 分钟;

2) 对于平末端或带有单链缺口的 DNA，反应条件为 16 $^{\circ}$ C 过夜或者室温 (20-25 $^{\circ}$ C) 2 小时。

- (4) 试验完成后，65 $^{\circ}$ C 加热，10 分钟，使酶失活。

- (7) 置于冰上并转移 1-5 μ l 连接产物到 50 μ l 感受态细胞里。

【产品质控】

- (1) 通过 SDS-PAGE 检测，纯度大于 95%。
- (2) 没有核酸外切酶，核酸酶，RNA 酶污染。
- (3) 通过 PCR 检测不含有宿主 DNA。