

T4 DNA Ligase

使用说明书

TaKaRa Code: D2011A

包 装 :

T4 DNA Ligase (350 U/ μ l)	25,000	Units
10 $\times$ T4 DNA Ligase Buffer	1	ml

保 存 : -20 $^{\circ}$ C

●制品说明

本酶催化相邻 DNA 链的 5' -P 末端和 3' -OH 末端以磷酸二酯键结合的反应, 需 ATP 作辅酶。本酶不仅可以催化粘性末端之间或平滑末端之间的 DNA 的连接, 也可以催化 DNA 与 RNA 之间以及少数 RNA 之间的连接。

●酶贮存溶液

Tris-HCl (pH 7.5)	10	mM
KCl	50	mM
DTT	1	mM
EDTA	0.1	mM
Glycerol	50	%

●起 源: *Escherichia coli* carrying the plasmid that enable highly expression of T4 DNA Ligase gene.

●活性定义

在 20 μ l 的连接反应体系中, 6 μ g 的 λ DNA-*Hind* III 的分解物在 16 $^{\circ}$ C 下反应 30 分钟时, 有 90% 以上的 DNA 片段被连接所需要的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

本酶的 1 U 相当于 ATP-PPi 交换反应中 0.008 Weiss Unit。

●纯 度

- 1) 2,000 U 的本酶和 1 μ g 的 λ -*Hind* III 片段在 37 $^{\circ}$ C 下反应 16 小时, DNA 的电泳谱带不发生变化。
- 2) 2,000 U 的本酶和 1 μ g 的 Supercoiled pBR322 DNA 在 37 $^{\circ}$ C 下反应 16 小时, DNA 的电泳谱带不发生变化。
- 3) 2,000 U 的本酶和 1 μ g 的 16S, 23S rRNA 在 37 $^{\circ}$ C 下反应 16 小时, RNA 的电泳谱带不发生变化。

●用 途

- 1) DNA 片段和载体 DNA 的连接。
- 2) DNA 片段和 Linker 或 Adaptor DNA 的连接。

●使用注意

连接反应因末端碱基顺序的不同而反应速度各异，一般有下列倾向：

突出末端：*Hind* III>*Pst* I>*Eco*R I>*Bam*H I>*Sal* I

平滑末端：*Hae* III>*Alu* I>*Hinc* II>*Sma* I

*Eco*R V>*Sca* I>*Pvu* II>*Nru* I

其中连接 *Hind* III 末端的速度约为连接 *Sal* I 末端速度的 10~40 倍；

而连接 *Hae* III 末端的速度约为连接 *Sma* I 末端速度的 5~10 倍。

●添附 Buffer 组成（保存：-20℃）

10×T4 DNA Ligase Buffer		
Tris-HCl (pH 7.6)	660	mM
MgCl ₂	66	mM
DTT	100	mM
ATP	1	mM

* Buffer 在融解时，如果出现少量沉淀属正常现象，请于 37℃ 保温溶解后使用。

●使用例

DNA 片段和载体 DNA 的连接

1. 在微量离心管中制备下列连接反应液。

10×T4 DNA Ligase Buffer	2.5	μl
DNA 片段*	约 0.3	pmol
载体 DNA**	约 0.03	pmol
T4 DNA Ligase	1	μl
dH ₂ O	up to 25	μl

* DNA 片段的摩尔数应控制在载体 DNA 摩尔数的 3~10 倍。

** 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。

2. 16℃过夜反应。
3. 加入 2.5 μl (1/10 量) 的 3 M CH₃COONa (pH5.2)。
4. 加入 62.5 μl (2.5 倍量) 的冷无水乙醇，-20℃放置 30~60 分钟。
5. 离心回收沉淀，用 70%的冷乙醇清洗沉淀，真空干燥。
6. 25~50 μl TE 溶解，10~20 μl 转化至 100 μl 的感受态细胞中。