



T4 DNA Ligase

T4连接酶

目录号：CW0805S (100 U) CW0805M (500 U) CW0805L (5000 U)

保存条件：-20℃。

产品内容

Component	CW0805S	CW0805M	CW0805L
	100 U	500 U	5000U
T4 DNA Ligase, 5 U/μL	20 μL	100 μL	1 mL
10×Ligation Buffer	150 μL	750 μL	5×1.5mL
50%PEG Solution	150 μL	750 μL	5×1.5mL

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的连接，修复双链DNA、RNA、DNA/RNA杂交中的单链中的单链切口，但是对于单链核苷酸，没有活性。

实验前准备及重要注意事项

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，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，建议使用之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

i 粘性末端的连接

1. 反应体系：

组分	20 μ L体系	终浓度
线性载体DNA	X μ L	20-100 ng
插入DNA片段	Y μ L	插入片段：载体1:1-5:1
10 \times Ligation Buffer	2 μ L	
T4 DNA Ligase, 5 U/ μ l	0.2 μ L	1 U
ddH ₂ O	补充至20 μ L	20 μ L

2. 涡旋震荡，瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底。
3. 反应条件：22 $^{\circ}$ C 孵育10分钟。
4. 瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底，65 $^{\circ}$ C 孵育10分钟或70 $^{\circ}$ C 孵育5分钟以灭活T4 DNA Ligase。
5. 可取5 μ L连接产物热击转化50 μ L感受态细胞或取1-5 μ L连接产物电击转化50 μ L感受态细胞。

注意：如需电击转化，推荐用乙醇沉淀法去除T4 DNA Ligase后进行电击转化。

ii 平末端的连接

1. 反应体系:

组分	20 μ L体系	终浓度
线性载体DNA	X μ L	20-100 ng
插入DNA片段	Y μ L	插入片段: 载体1:1-5:1
10 \times Ligation Buffer	2 μ L	
T4 DNA Ligase, 5 U/ μ L	1 μ L	5 U
50%PEG Solution	2 μ L	5%
ddH ₂ O	补充至20 μ L	20 μ L

2. 涡旋震荡, 瞬间离心, 将管壁上的溶液收集到管底。
3. 反应条件: 22 $^{\circ}$ C 孵育1小时。
4. 瞬间离心, 将管壁上的溶液收集到管底, 65 $^{\circ}$ C 孵育10分钟或70 $^{\circ}$ C 孵育5分钟以灭活 T4 DNA Ligase。
5. 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。

注意: 如需电击转化, 推荐用乙醇沉淀法去除T4 DNA Ligase后进行电击转化。

iii 线性DNA的自身环化

1. 反应体系:

组分	50 μ L体系	终浓度
线性载体DNA	X μ L	5-50 ng
10 \times Ligation Buffer	5 μ L	
T4 DNA Ligase, 5 U/ μ L	1 μ L	5 U
ddH ₂ O	补充至50 μ L	50 μ L

2. 涡旋震荡, 瞬间离心, 将管壁上的溶液收集到管底。
3. 反应条件: 粘性末端22 $^{\circ}$ C 孵育10分钟; 平末端22 $^{\circ}$ C 孵育1小时。
4. 瞬间离心, 将管壁上的溶液收集到管底, 65 $^{\circ}$ C 孵育10分钟或70 $^{\circ}$ C 孵育5分钟以灭活 T4 DNA Ligase。
5. 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。

注意: 如需电击转化, 推荐用乙醇沉淀法去除T4 DNA Ligase后进行电击转化。