

使用说明书

GeneCopoeiaTM
Expressway to Discovery

GeneCopoeia Inc.
19520 Amaranth Drive
Germantown, Maryland 20874
USA
Tel: 301-515-6982; 1-866-360-9531
Fax: 301-515-6983
Web: www.genecopoeia.com

T4 DNA Ligase

T4 DNA 连接酶

产品套装编号: A0101A, 本套装包含以下产品:

产品内容	产品编号	包装规格
T4 DNA Ligase (400U/μl)	A01010A	50μl
10×T4 DNA Ligase Buffer	A01011A	0.5ml

保存条件: -20 °C

■ 产品概述

本酶催化相邻DNA或RNA链的5'-P末端和3'-OH末端形成磷酸二酯键的反应。本酶不仅可以催化粘性末端之间或平滑末端之间的DNA连接, 还可以修复双链DNA、RNA或DNA/RNA杂交双链中的单链切口, 但对单链DNA或RNA无连接作用。

■ 来源

E. coli 重组表达。

■ 酶活性单位定义

20μl连接反应体系中, 5'-末端浓度为0.12μM(300μg/ml)的条件下, 16°C反应30分钟, 能使50%经Hind III消化的λDNA片段连接所需酶量定义为一个粘性末端连接活性单位U。一个粘性末端连接活性单位相当于0.015个韦氏(ATP-PP交换)单位。

■ 推荐反应条件

粘性末端连接: 20μl反应体系中加入1μl T4 DNA连接酶, 反应10分钟。

平末端连接: 20μl反应体系中加入1μl T4 DNA连接酶, 反应2小时。

■ 反应缓冲液

1×T4 DNA Ligase Buffer: 50mM Tris-HCl(pH7.5, 25°C), 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, 25μg/ml BSA。

■ 贮存缓冲液

50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH7.4), 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 200μg/ml BSA, 50%甘油。

■ 活性抑制

T4连接酶活性在NaCl或KCl浓度大于200mM时被很大程度地抑制。

■ 应用范围

限制性酶切片段的克隆; 将Linkers或Adapters连接到DNA片段的平滑末端; 连接酶介导的RNA检测; 定向诱变等。

■ 常见问题解答

1. 问：如果用连接酶连接后转化失败，可能有哪些原因？

答：首先检查连接体系是否正常：含ATP的缓冲液长期储存可能导致ATP降解，从而使连接反应失败；DNA样品中是否存在高浓度的盐或者EDTA；连接酶是否失活，用HindⅢ消化的λDNA作对照反应。

如连接底物曾做过去磷酸化反应，应考虑去磷酸化酶(如：CIP、BAP、SAP等)是否彻底灭活；连接反应时DNA浓度是否过高(正常情况下一般为1-10ug/ml)，导致反应仅产生线性DNA产物；连接反应重叠碱基过短，应增加连接酶用量，并增加反应时间；如连接片段或质粒没有磷酸化，应首先加入磷酸化酶，进行磷酸化反应；转化反应时加入连接反应混合物过多，一般在50μl感受态细胞中加入1-5μl连接反应混合物；插入片段过大，导致不能连接形成环状DNA；形成的质粒太大(>10kp)，不能用化学方法进入感受态细胞，应改用电击法。

2. 问：限制性内切酶反应会影响连接吗？

答：限制性内切酶未被完全灭活可影响连接反应，可用热失活的方法灭活。若不能热失活，则用酚/乙醇纯化DNA样品。限制性内切酶有非特异性酶切序列的星号活力时，可减少酶用量或缩短反应时间。限制性内切酶中可能存在外切酶或磷酸酶污染，从而破坏连接末端。

3. 问：T4 DNA连接酶能热失活吗？

答：可以，在65℃加热20分钟即可。但当反应缓冲液中含有PEG时，不推荐用热失活，因为可能会对转化反应产生抑制。