

# 使用说明书

## T4 DNA Ligase

Cat. No. FF004 (20,000 U)  
FF005 (100,000 U)

| 产品内容                   | 产品编号     | 规格     |
|------------------------|----------|--------|
| T4 DNA Ligase(400U/μl) | FF004-01 | 50 μl  |
| 10× Ligase buffer      | FF004-02 | 500 μl |

保存条件：-20℃ 保存 12 个月，请注意避免反复冻融

### ■ 产品说明

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

1单位是指在 20 μl 反应体系，6ug λ DNA-HindIII 片段在16℃条件下反应30分钟时，催化50%以上的DNA片段发生连接所需的酶量。

### ■ 活性抑制

65℃孵育20 min可以导致T4 DNA Ligase失活；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

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；双螺旋DNA 杂交体中的缺口修复；线性 DNA 的自环化等。

### ■ 储存缓冲液

10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 50% Glycerol, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.4。

## ■ 片段连接

1) 在反应管按照下表组分进行制备

| 组分                      | 用量       | 终浓度     |
|-------------------------|----------|---------|
| 待连接片段                   | 1 µg     | -       |
| T4 DNA Ligase(400 U/µl) | 1 µl     | 20 U/µl |
| 10× Ligase buffer       | 2 µl     | 1 ×     |
| ddH <sub>2</sub> O      | To 20 µl | -       |
| 总体积                     | 20 µl    | -       |

2) 黏性末端为25℃孵育30min，平末端为25℃孵育2h，提高平末端连接产物可在16℃反应过夜。

## ■ 目的片段与载体连接

1) 在反应管按照下表组分进行制备

| 组分                      | 用量              | 终浓度     |
|-------------------------|-----------------|---------|
| 目的片段                    | 与载体摩尔比率为1:1到5:1 | -       |
| 载体                      | 20-100 ng       | -       |
| 10× Ligase buffer       | 2 µl            | 1 ×     |
| T4 DNA Ligase(400 U/µl) | 1 µl            | 20 U/µl |
| ddH <sub>2</sub> O      | To 20 µl        | -       |
| 总体积                     | 20 µl           | -       |

2) 黏性末端为25℃孵育30min，平末端为25℃孵育2h，提高平末端连接产物可在16℃反应过夜。

## ■ 常见问题解答

1、如果用连接酶连接后转化失败，可能有哪些原因？

答：首先排查连接体系：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；样品中是否存在高浓度的盐或EDTA；连接酶是否失活，用HindIII消化的DNA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1-10µg/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、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、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。

4、平末端连接效率低怎么办？

答：可以加入PEG 4000至终浓度为5%以增加连接效率，或16℃反应过夜。

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。