

## T4 DNA Ligase (Fast)

REF: MD001

### 储运条件

-20°C 保存。

### 产品组成

组分/规格	MD001S-200 U	MD001M-1000 U
T4 DNA Ligase (5 U/μl)	40μl	200μl
10× T4 DNA Ligase Buffer	200μl	1ml
50% PEG	200μl	1ml

▲注: 1 U=1 Weiss unit

### 产品简介

T4 DNA Ligase (Fast) 由携带 T4 噬菌体 gene 30 的大肠杆菌产生。该酶催化双螺旋 DNA 或 RNA 之间的 5'-磷酸基团和 3'羟基之间形成磷酸二酯键。该酶在双链 DNA、RNA 或者 DNA/RNA 复合物间可修复单链缺刻, 并且可以连接有粘性末端或者平末端的 DNA 片段, 但对于单链核酸无活性, 主要用于限制性内切酶酶切产物 DNA 片段克隆、基因定点突变与 PCR 产物克隆、修复双链 DNA 缺刻与线性 DNA 自环化。T4 DNA Ligase 需要 ATP 作为辅助因子, 在室温下完成粘性末端连接反应仅需 10 分钟。

### 酶活单位定义

37°C条件下, 1 Weiss unit 的酶在 20 min 内催化 1 nmol 的 [32PPi] 转变为活性炭吸附态。1 Weiss unit 等同于约 200 个粘性末端连接反应单位 (CEU) 1 Weiss Unit-200CEU。1CEU 相当于在 16°C条件下, 30 min 内连接 50% HindIII 消化后的 λDNA 片段。

### 酶活检测条件

酶活在如下反应混合物中进行测试: 66 mM Tris-HCl (pH 7.6), 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.066 mM ATP, 10 mM DTT, 3.3 μM [32PPi]。

### 质量控制

#### 核酸内切酶残留测试

37°C条件下, 将 200 U 的 T4 DNA Ligase (Fast) 与 1 μg 的 pUC19 DNA 中温育 4 h, 未检测出由共价闭环状 DNA 转变为带有缺刻的 DNA。

#### 核酸外切酶残留测试

将酶液与双链 DNA 底物在 37°C温育 16 h, 通过 DNA 电泳检测双链 DNA 底物无变化。

#### 蓝白斑测试

室温条件下, 使用 30 U T4 DNA Ligase (Fast) 连接 pUC57 DNA/ HindIII, pUC57 DNA/PstI 及 pUC57 DNA/SmaI 消化产物 1 h, 然后用 E.coli XL1-Blue 感受态细胞转化连接产物, 检测到少于 1% 的白斑。

### 使用方法

#### 1. DNA 插入片段连接至载体 DNA (粘性末端连接)

①于冰上配制如下反应体系:

试剂	使用量
线性化载体 DNA	20~100 ng
插入片段 DNA	1:1~5:1 (片段: 载体摩尔比)
10× T4 DNA Ligase Buffer	2μl
T4 DNA Ligase	1U (0.2μl)
Nuclease-Free Water	To 20 μl

②充分混匀并瞬离, 22°C温育 10 min。

③取 1~5 μl 的连接产物用于 50 μl 化学感受态细胞的转化, 或者取 1~2 μl 用于 50 μl 电转感受态细胞的转化。

▲注: 如果连接反应产物用于电转化, 应使用离心柱或者氯仿抽提清除 DNA 代替热失活步骤。

#### 2. DNA 插入片段连接至载体 DNA (平末端连接)

①于冰上配制如下反应体系:

试剂	使用量
线性 DNA	20~100ng
插入片段 DNA	1:1~5:1 (片段: 载体摩尔比)
10× T4 DNA Ligase Buffer	2μl
50% PEG	2μl
T4 DNA Ligase	5U (1μl)
Nuclease-Free Water	To 20 μl

②充分混匀并瞬离, 22°C温育 1 h;

③取 1~5 μl 的连接产物用于 50 μl 化学感受态细胞的转化, 或者取 1~2 μl 用于 50 μl 电转感受态细胞的转化。

▲注: 如果连接反应产物用于电转化, 应使用离心柱或者氯仿抽提清除 DNA 代替热失活步骤。



### 3. 线性 DNA 自环化

①于冰上配制如下反应体系:

试剂	使用量
线性化 DNA	10~50 ng
10× T4 DNA Ligase Buffer	5 $\mu$ l
T4 DNA Ligase	5U (1 $\mu$ l)
Nuclease-Free Water	To 50 $\mu$ l

②彻底混匀并瞬离, 22°C温育 10 min;

③取 1~5 $\mu$ l 的连接产物用于 50 $\mu$ l 化学感受态细胞的转化, 或者取 1~2  $\mu$ l 用于 50  $\mu$ l 电转感受态细胞的转化。

**▲注:** 如果连接反应产物用于电转化, 应使用离心柱或者氯仿抽提清洁 DNA 代替热失活步骤。

### 4. 接头连接

双链寡核苷酸接头经常被用于在插入片段上产生粘性末端。接头 通常包含限制酶识别位点, 在连接后经酶切处理产生和克隆载体匹配的粘端。有时候接头已包含与克隆载体匹配的粘端, 此时无需在接头连接完成后进行插入片段的进一步处理。

① 于冰上配制如下反应体系:

试剂	使用量
线性化 DNA	100 ~500ng
磷酸化接头	1~2 $\mu$ g
10× T4 DNA Ligase Buffer	2 $\mu$ l
50% PEG	2 $\mu$ l
T4 DNA Ligase	2U (0.4 $\mu$ l)
Nuclease-Free Water	To 20 $\mu$ l

②彻底混匀并瞬离, 22°C温育 10 min;

③在 65°C作用 10 min 或者 70°C作用 5 min, 进行热失活。

**▲注:** 添加 0.5 mM ATP 的条件下, T4 DNALigase 在伊势久 FastCut 限制酶切缓冲液中具有 100%的活力。因此, 接头连接反应时可以在 FastCut 限制酶切缓冲液中进行, 以简化“接头连接-酶切”实验流程。具体方法为: 接头连接反应完成后, 先失活 T4 DNA Ligase, 然后向该体系中添加 ATP 至终浓度 0.5 mM, 再在体系中加入适量的伊势久快速内切酶, 最后使用最适酶切反应温度进行温育即可。

## 注意事项

1. T4 DNA Ligase (Fast) 在浓度高于 200 mM 的 NaCl 或 KCl 中会被强烈抑制;
2. 连接反应液添加量不应该超过感受态细胞体积的 10%, 不推荐体系中加入过量的 T4 DNA Ligase (Fast);
3. 与 T4 DNA Ligase (Fast) 结合的 DNA 可能会在琼脂糖凝胶中出现带移或弥散, 为了避免此现象, 可以在上样前对酶进行热失活, 必要时加入适量的 SDS;
4. 聚乙二醇(PEG)能极大地提高平末端连接的连接效率, PEG 4000 的推荐添加量是连接体系的 5% (w/v);
5. 电转化效率可能通过对 T4 DNA Ligase (Fast) 热失活或者使用离心柱或者氯仿抽提纯化 DNA 方式来提高;
6. 转化子数目可通过延长反应时间至 1 h 而增加。

