

产品简介

T4 DNA Ligase (Quick)来源于携带 T4 DNA Ligase 改造基因的大肠杆菌感受态细胞重组表达获得，该酶在 ATP 作为辅助因子作用下，可催化 dsDNA 平末端或粘性末端相邻核酸的 5'磷酸末端和 3'羟基末端形成磷酸二酯键。还可修补双链 DNA、双链 RNA 或 DNA/RNA 杂合物上的单链缺口，但不能催化全单链核苷酸连接。

产品特点

5 min 快速连接片段；室温反应；适用于所有常规连接

产品组成

| 组 分 | M111 (40,000 U) | M111 (80,000 U) |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| T4 DNA Ligase (Quick) (800 U/μl) | 50 μl | 100 μl |
| 2 × Quick Ligation Buffer | 500 μl | 1 ml |

产品应用

克隆载体

T/A 克隆

线性 DNA 环化

高通量文库构建

单位定义

在 50 μl 的连接反应体系中，100 ng 的 λDNA-Hind III 分解物在 25°C 下反应 30 min 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)。

质量控制

核酸外切酶残留检测：20 U 本品和 0.6 μg λ-Hind III 在 74°C 下孵育 1 h，DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：20 μl 反应体系，10 U 本品和 1 μg λDNA，37°C 温育 4 h，DNA 的电泳谱带无变化。

RNase 残留检测：20 U 本品和 1 μg Hela 细胞总 RNA 在 37°C 下孵育 30 min，RNA 的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌残留 DNA 残留检测：50 μl 体系中，以 ddH₂O 为模板，扩增 *E. coli* 16s rDNA 基因。30 个循环后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，染色，无扩增条带。

储存条件

-20°C保存，于-20 ~ 0°C运输。▲避免反复冻融。

实验方案

DNA 片段连接

1. 体系配制

| 组分 | 用量 |
|----------------------------------|-----------|
| 2 × Quick Ligation Buffer | 10 μl |
| 插入片段 ^a | 0.3 mol |
| 载体 DNA ^b | 0.03 pmol |
| T4 DNA Ligase (Quick) (800 U/μl) | 1 μl |
| ddH ₂ O | to 20 μl |

a. DNA 片段的摩尔数应控制在载体 DNA 摩尔数的 3~10 倍。

b. 平末端载体与片段进行连接时，应首先将载体进行去磷酸化处理，防止其自身环化。

2. 16°C过夜反应。

3. 10 ~ 20 μl 转化至 100 μl 的感受态细胞中。

DNA 片段连接

1. 体系配制

| 组分 | 用量 |
|----------------------------------|----------|
| 2 × Quick Ligation Buffer | 25 μl |
| dA-Tailing 产物 ^a | 15 μl |
| DNA Adapter ^b | 3 μl |
| T4 DNA Ligase (Quick) (800 U/μl) | 4 μl |
| ddH ₂ O | to 50 μl |

移液器吹打混匀

a. 产物为 5'端磷酸化，3'端带 dA 的 DNA 片段。

b. dA-Tailing 产物与 DNA Adapter 的摩尔浓度比在 1:10 ~ 1:20。

2. 连接反应条件设置

| 温度 | 时间 |
|------|--------|
| 25°C | 10 min |
| 4°C | Hold |

注意事项

1. 建议插入片段与载体的摩尔比应在 3:1 - 10:1。
2. 平末端载体与片段进行连接时，应首先将载体进行去磷酸化处理，防止其自身环化。
3. dA-Tailing 产物与 DNA Adapter 的摩尔浓度比在 1:10 - 1:20。
4. T4 DNA Ligase 不稳定，使用时冰上操作，用完立即放回-20°C。

实验案例

1. 将带有 Hind III 酶切位点的环形和线性基因片段用 Hind III 切割后，用小牛肠磷酸酶进行处理和凝胶纯化。使用快速连接试剂盒 T4 DNA Ligase (Quick)(ATG #M111)将酶切后的线性基因片段连接到线性载体中，插入片段与载体的比例 3:1。将连接产物转化到 DH5 α 细胞中，并在 37°C 条件下 LB-AMP 抗性平板上过夜培养，不同连接反应时间结果，可通过转化后菌密度反映。结果表明 25°C 5 min 的连接反应条件已可得到较高效率的 DNA 连接 (Fig. 1)。

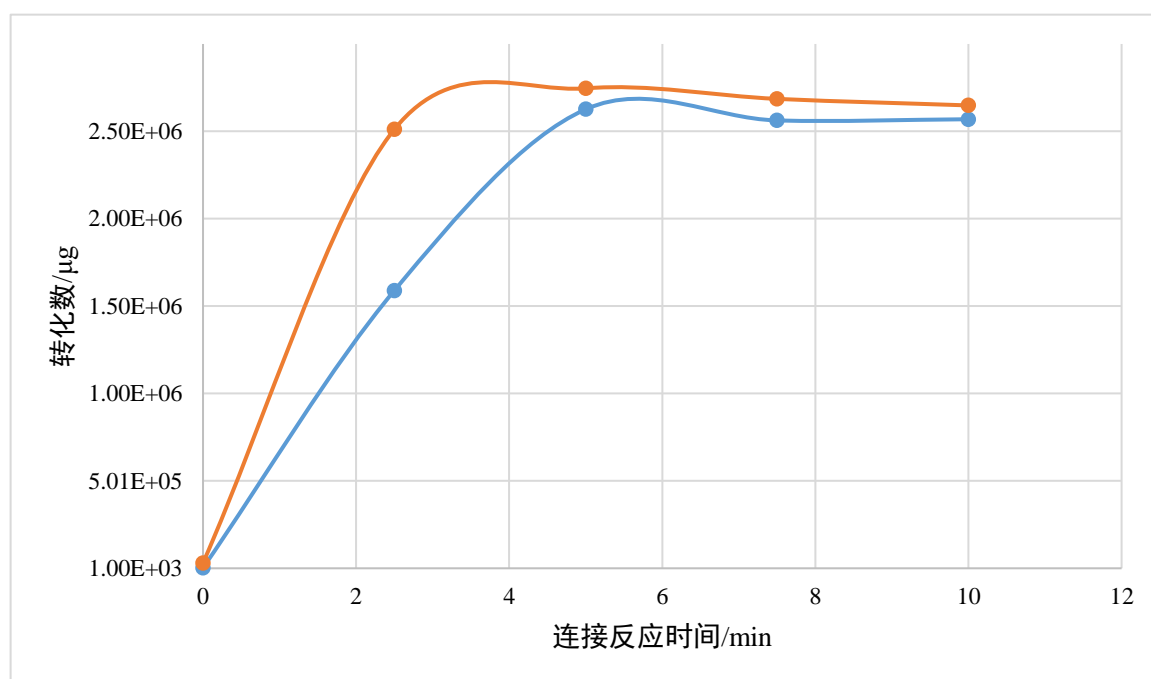


Fig. 2 T4 DNA Ligase (Quick) 连接效率检测