

T4 DNA连接酶

组分	#M0081	#M0082
T4 DNA连接酶 (400 U/μl)	50 μl	50 μl×5
10× 反应缓冲液 (包括10mM ATP)	0.5 ml	0.5 ml×5

概述: 该酶催化契合的双链DNA或RNA的5'-磷酸末端和3'-羟基末端形成磷酸二酯键。该酶不仅能够催化平滑末端或粘性末端DNA之间的连接, 还可以修复双链DNA、RNA或DNA/RNA杂交双链中的单链切口⁽¹⁾。

来源: 纯化自重组*E. coli*菌株。

应用:

1. 限制性酶切片段的克隆⁽²⁾。
 2. 将linker或adaptor连接到DNA片段的平滑末端。
- 贮存溶液:** 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 @ 25°C), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 50%甘油 (V/V)。

反应条件: 1×反应缓冲液16°C温育。

1×反应缓冲液: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 @ 25°C), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP。

单位定义 (粘性末端连接活性定义): 20 μl T4 DNA连接酶反应体系中, 0.12 μM 5'末端浓度, 16°C反应30分钟, 能使50%经HindIII消化的λDNA片段连接所需的酶量定义为一个活性单位。

热失活: 65°C温育10分钟即可失活。

储存温度: -20°C。

质量控制检测:

核酸外切酶活性: 50 μl不含ATP的反应体系中, 3,200 U本酶与1 μg的HindIII消化的λDNA在37°C下温育4小时, DNA的电泳条带无明显变化。

核酸内切酶活性: 50 μl不含ATP的反应体系中, 3,200 U本酶与1 μg的pUC19质粒于37°C下温育4小时, <5%的pUC19质粒由超螺旋变为缺刻状态。

纯度: 经SDS-PAGE (考马斯亮蓝染色) 检测其纯度大于95%。

注意事项:

1. ATP是反应必须的辅助因子。而大肠杆菌DNA连接酶则需要NAD作为辅助因子。
2. 如T4 DNA连接酶稀释后于-20°C贮存, 应选用含50%甘油 (V/V) 的贮存缓冲液; 如稀释后立即使用, 则用1×T4 DNA连接酶反应缓冲液稀释即可。

参考文献:

1. Engler, M.J. and Richardson, C.C. (1982). In P.D. Boyer (Ed.), *The Enzymes* Vol. 5, (p. 3). San Diego: Academic Press.
2. Sambrook, J., et al. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (3rd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

使用说明:

DNA片段和载体DNA的连接

1. 在微量离心管中制备以下连接反应液

成分	20 μl反应体系	10 μl反应体系
10×反应缓冲液	2 μl	1 μl
DNA片段*	x μl	x μl
载体DNA*	x μl	x μl
T4 DNA连接酶	1-2 μl	0.5-1 μl
水	补充至20 μl	补充至10 μl

[*]: DNA片段的摩尔数应控制在载体DNA摩尔数的3-10倍; 平末端的载体与DNA片段连接时, 应首先将载体进行去磷酸化处理, 以防止其自身环化。



T4 DNA连接酶

2. 连接反应条件：22°C连接2小时或16°C连接过夜。
3. 取5-10 μ l连接产物转化至100 μ l感受态细胞中。