

产品描述

T4 DNA Ligase 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, 还可催化 RNA 和双链中的 ssDNA 或 RNA 链连接, 但不能催化全单链核苷酸连接。适用于标记 RNA 3' -末端, 环化 RNA 和 DNA 寡聚核苷酸以及克隆 cDNA 等核酸操作。

产品应用

用于 DNA 片段和载体 DNA 的连接以及 DNA 片段和 Linker 或 Adaptor DNA 的连接。

产品组成

| 组份 | PV514 10000U |
|--------------------------|--------------|
| 10 × Ligase Buffer* | 250 μl |
| T4 DNA Ligase (400 U/μl) | 25 μl |

*Buffer 在融解时, 如果出现少量沉淀属正常现象, 请颠倒混匀后使用。

产品储存

-20°C 保存。

单位定义

1 单位指在 20 μl 1X T4 DNA 连接酶反应缓冲液中, 16°C 反应条件下, 30 分钟能使 50% 的经 HindIII 消化的 λ DNA 片段 [5' 端浓度为 0.12 μM (300 μg/ml)] 连接所需的酶量。

质量控制

核酸外切酶残留检测: 2000 U 的本品和 0.6 μg λ -Hind III 在 74°C 下反应 1 小时, DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测: 2000 U 的本品和 0.6 μg Supercoiled pBR322 DNA 在 74°C 下反应 1 小时, DNA 电泳谱带不发生变化。

使用实例(DNA 片段和载体 DNA 的连接)

1. 在微量离心管中配制连接反应体系:

| | |
|--------------------------|-----------|
| ddH ₂ O | to 10 μl |
| 10 × Ligase Buffer | 1 μl |
| 插入片段 ^① | 0.3 pmol |
| 载体DNA ^② | 0.03 pmol |
| T4 DNA Ligase (400 U/μl) | 1 μl |

①插入片段与载体的摩尔比应在 3:1 ~ 10:1 之间。

②平末端载体与 DNA 片段进行连接时, 应首先将载体进行去磷酸化处理, 以防止其自身环化。

2. 16°C 过夜反应。

3. 转化

1) 将连接产物加入到 100 μl 感受态细胞中 (连接产物的体积不应超过感受态细胞体积的 1/6), 轻轻弹匀, 冰上孵育 30 分钟。

2) 将离心管置于 42°C 水浴, 不要晃动, 准确热激 90 秒后, 立刻置于冰水浴中, 静置 2-3 分钟。

3) 向离心管中加入 900 μl LB 或 SOC 培养基, 150 rpm, 37°C 振荡培养 45 分钟, 使菌体复苏, 抗性基因表达。

4) 2,500 g 离心 5 分钟, 去掉 900 μl 上清。用剩余培养基将菌体重悬, 用无菌涂布棒在含有正确抗性的平板上轻轻涂匀。室温正置 10 分钟。

待菌液被平板吸收后, 37°C 倒置培养过夜。

注: 如果使用超级感受态细胞 (转化效率 > 10⁸ cfu/μg), 可直接吸取 100-200 μl 孵育后的菌液涂板。剩余菌液可在 4°C 保存, 一周之内都可重新涂板。