

# T4 DNA Ligase

## T4 连接酶

项目号: T665705 (100 U)  
T665705 (500 U)  
T665705 (5000 U)

保存条件: -20°C

### 产品内容

组分	T665705 100 U	T665705 500 U	T665705 5 KU
T4 DNA Ligase 5 U/ L	20 L	100 L	1 mL
10×Ligation Buffer	150 L	750 L	5×1.5mL
50%PEG Solution	150 L	750 L	5×1.5mL

### 产品简介

T4 DNA Ligase 是从表达 T4 DNA Ligase 基因的大肠杆菌经诱导表达后分离纯化而来的, 催化相邻 DNA 链的 5' 磷酸基团和 3' 羟基基团以磷酸二酯键结合反应。该酶可催化平末端或粘性末端 DNA 的连接, 修复双链 DNA、RNA、DNA/RNA 杂交中的单链中的单链切口, 但是对于单链核苷酸, 没有活性。

### 实验前准备及重要注意事项

1. T4 DNA Ligase 的最终用量不要超过推荐的用量, 否则影响连接效率。
- 2, PEG 可以极大提高平末端的连接效率, 我们推荐加入终浓度为 5% PEG Solution 以提高平末端的连接效率。
- 3, 为了提高转化效率, 建议所加入连接产物的量不要超过感受态细胞体积的 10%

4. 由于 T4 DNA Ligase 中含有甘油，比较粘稠容易挂壁，建议使用之前短暂离心将液体收集到管底，取样时枪头尽量不要深入液面太深以免粘在枪头上造成损失

## 使用方法

### i 粘性末端的连接

#### 1. 反应体系:

组分	20 $\mu$ L 反应体系	终浓度
线性载体 DNA	X $\mu$ L	20-100 ng
插入 DNA 片段	Y $\mu$ L	插入片段:载体 1:1-5:1
10 $\times$ Ligation Buffer	2 $\mu$ L	/
T4 DNA Ligase 5 U/ $\mu$ L	0.2 $\mu$ L	1 U
ddH2O	补充至 20 $\mu$ L	20 $\mu$ L

2. 涡旋震荡，瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底。

3. 反应条件:22C 孵育 10 分钟。

4. 瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底，65C 孵育 10 分钟或 70C 孵育 5 分钟以灭活 T4 DNA Ligase

5. 可取 5 $\mu$ L 连接产物热击转化 5 $\mu$ L 感受态细胞或取 15 $\mu$ L 连接产物电击转化 50 $\mu$ L 感受态细胞。

**注意:**如需电击转化，推荐用乙醇沉淀法去除 T4 DNA Ligase 后进行电击转化

### ii 平末端的连接

#### 1. 反应体系:

组分	20 $\mu$ L 反应体系	终浓度
线性载体 DNA	X $\mu$ L	20-100 ng
插入 DNA 片段	Y $\mu$ L	插入片段:载体 1:1-5:1
10 $\times$ Ligation Buffer	2 $\mu$ L	/
T4 DNA Ligase, 5 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L	5 U
50%PEG Solution	2 $\mu$ L	5%

ddH <sub>2</sub> O	补充至 20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
--------------------	----------------	------------

2. 涡旋震荡，瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底。
  - 3, 反应条件:22C 孵育 1 小时。
  4. 瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底，65C 孵育 10 分钟或 70C 孵育 5 分钟以灭活 T4 DNA Ligase
  5. 可取 5L 连接产物热击转化 50pL 感受态细胞或取 1-2L 连接产物电击转化 50pL 感受态细胞。
- 注意:**如需电击转化，推荐用乙醇沉淀法去除 T4 DNA Ligase 后进行电击转化

### iii 线性 DNA 的自身环化

1. 反应体系:

组分	50 $\mu$ L 反应体系	终浓度
线性载体 DNA	X $\mu$ L	5-50 ng
10xLigation Buffer	5 $\mu$ L	/
T4 DNA Ligase, 5 U/uL	1 $\mu$ L	5 U
ddH <sub>2</sub> O	补充至 50 $\mu$ L	50 $\mu$ L

2. 涡旋震荡，瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底。
  - 3, 反应条件:粘性末端 22C 孵育 10 分钟:平末端 22C 孵育 1 小时。
  4. 瞬间离心，将管壁上的溶液收集到管底，65C 孵育 10 分钟或 70C 孵育 5 分钟以灭活 T4 DNA Ligase
  5. 可取 5pL 连接产物热击转化 5pL 感受态细胞或取 1-2pL 连接产物电击转化 50pL 感受态细胞。
- 注意:**如需电击转化，推荐用乙醇沉淀法去除 T4 DNA Ligase 后进行电击转化