T3 DNA Ligase

产品目录号：RK20509

产品组分

组分名称	组分目录号	浓度	规格-1 100,000 U	规格-2 750,000 U
T3 DNA Ligase	RM21513	3,000,000 U/mL	34 μL	250 μL
2X Universal DNA Ligase Buffer	RM20807	2X	1 mL	1 mL × 3

产品说明

T3 DNA Ligase 来源于 T3 噬菌体，它是一种 ATP 依赖型双链 DNA 连接酶，该酶可以有效地催化双链 DNA 或 RNA 的 5'-磷酸与 3'-羟基之间形成磷酸二酯键。T3 DNA Ligase 可以有效催化粘性末端分子间或平齐末端分子间的连接，也能修复双链 DNA 或 DNA-RNA 杂交双链上的单链 DNA 切口，同时 T3 DNA 连接酶会封闭这些 DNA 底物的缝隙。此外，T3 DNA Ligase 对 NaCl 的耐受性是 T4 DNA Ligase 的 2 倍。

在 T3 DNA Ligase 反应体系中加入 PEG 6000 可提高对平齐末端的连接效率。当某些实验中不能使用 PEG 6000 时，可使用 1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer，但 T3 DNA Ligase 酶活会降低约 10 倍。若反应中需要维持高浓度 NaCl，建议使用不含 PEG 6000 的缓冲液。

产品来源

T3 噬菌体来源的 T3 DNA Ligase 在大肠杆菌中重组表达和分离纯化得到。

活性定义

1 活性单位 (U)指 HindIII 酶切的 λDNA 片段 100 ng，在 20 μL 体系的 1X Universal DNA Ligase Buffer 中，25°C 反应 1 min，连接 50% DNA 片段所需的酶量。

酶存储液

10 mM Tris-HCl，50 mM KCl，1 mM DTT，50% Glycerol，0.1 mM EDTA，pH 7.4 @ 25°C

保存温度

-20°C

反应条件

1X Universal DNA Ligase Buffer，25°C孵育

1X Universal DNA Ligase Buffer 组成

66 mM Tris-HCl,10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 7.5% Polyethylene glycol (PEG 6000), pH 7.5 @ 25°C

热失活

否

操作说明

1. 按下表所示在冰上加入各反应组分（以 20 μL 反应体系为例）；

组分	用量
2X Universal DNA Ligase Buffer*	10 μL
载体 DNA (4 kb)	50 ng (0.02 pmol)
插入 DNA 片段 (1 kb) **	37.5 ng (0.06 pmol)
T3 DNA Ligase***	1 μL
Nuclease-free Water	Up to 20 μL

注 1：*, 2X Universal DNA Ligase Buffer 在融解时，如果出现少量沉淀属正常现象，请待溶液恢复至室温，震荡混匀后使用；

注 2：**，连接反应按载体：插入片段摩尔比为 1：3 进行；

注 3：***, T3 DNA Ligase 应最后加入反应体系中。

2. 各反应组分混匀并短暂离心收集溶液到管底；
3. 快速转移至 25°C 的 PCR 仪中孵育 15~30 min；

注：由于反应体系中含有 PEG 6000，因此 T3 DNA Ligase 不能进行热失活，否则会显著降低后续的转化效率。

4. 将反应产物置于冰上，取 1-5 μL 连接产物加入到 50 μL 感受态细胞中转化，或将连接产物保存至-20°C。