

## 产品组分

| 组分名称                              | 组分目录号   | 规格-1        | 规格-2        |
|-----------------------------------|---------|-------------|-------------|
|                                   |         | 20,000 U    | 100,000 U   |
| Heat-T4 DNA Ligase (400,000 U/mL) | RM21512 | 50 $\mu$ L  | 250 $\mu$ L |
| 10X T4 DNA Ligase Reaction Buffer | RM20108 | 500 $\mu$ L | 500 $\mu$ L |

## 产品说明

Heat-T4 DNA Ligase 是 T4 DNA 连接酶的耐热突变体,可催化双链 DNA 或 RNA 的 5'-磷酸基团与 3'-羟基之间形成磷酸二酯键,在比野生型 T4 DNA 连接酶更高的温度下起作用。该催化反应需 ATP 作为辅助因子,Heat-T4 DNA Ligase 在温度高达 45°C 时可以催化粘性末端分子间或平末端分子间的连接,也能修复双链 DNA 或 DNA-RNA 杂交双链上的单链 DNA 切口,同时 T4 DNA 连接酶会封闭这些 DNA 底物的缝隙。

## 产品来源

T4 噬菌体来源的 T4 DNA Ligase 基因在大肠杆菌中重组表达并经过多步纯化精制而成。

## 活性定义

1 活性单位 (U)指  $\lambda$  DNA (经 HindIII 酶切, 5'粘性末端 DNA 浓度 0.12  $\mu$ M, 300  $\mu$ g/mL) 在 20  $\mu$ L 体系的 1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer 中, 16°C 反应 30 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, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, pH 7.4 @ 25°C

## 保存温度

-20°C

## 反应条件

1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer

## 1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer 组成

50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7.5 @ 25°C

## 热失活

65°C 加热 10 min

## 操作说明

1、按下表所示在冰上加入各反应组分 (以 20  $\mu\text{L}$  反应体系为例):

| 组分                                             | 用量                     |
|------------------------------------------------|------------------------|
| 10X T4 DNA Ligase Reaction Buffer <sup>*</sup> | 2 $\mu\text{L}$        |
| 载体 DNA (4 kb)                                  | 50 ng (0.02 pmol)      |
| 插入 DNA 片段 (1 kb) <sup>**</sup>                 | 37.5 ng (0.06 pmol)    |
| Heat-T4 DNA Ligase <sup>***</sup>              | 1 $\mu\text{L}$        |
| ddH <sub>2</sub> O                             | Up to 20 $\mu\text{L}$ |

注 1: <sup>\*</sup>, 10X T4 DNA Ligase Reaction 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: <sup>\*\*</sup>, 连接反应按载体: 插入片段摩尔比为 1: 3 进行。

注 3: <sup>\*\*\*</sup>, Heat-T4 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、置于 25-50°C 孵育 10 min 或 16°C 反应过夜。

4、(可选) 65°C 加热 10 min 以热失活 Heat-T4 DNA Ligase。

注: 此步骤非必须, 如果残留的 Heat-T4 DNA Ligase 会影响后续实验, 可以对酶进行热失活处理。

5、将反应产物置于冰上, 取 1-5  $\mu\text{L}$  连接产物加入到 50  $\mu\text{L}$  感受态细胞中, 进行转化。