

## T4 DNA Ligase (Fast)

REF: EG15205S

### 储存条件

-20°C保存 2 年

### 产品组成

组分	规格
T4 DNA Ligase (Fast)	200 μl (5 U/μl)
10× T4 DNA Ligase Buffer	2×1 ml
50% PEG	1 ml

注：1 U=1 Weiss unit

### 产品简介

T4 DNA Ligase (Fast) 由携带 T4 噬菌体 gene 30 的大肠杆菌产生。该酶催化双螺旋 DNA 或 RNA 之间的 5'- 磷酸基团和 3'- 羟基之间形成磷酸二酯键。该酶在双链 DNA、RNA 或者 DNA/RNA 复合物间可修复单链缺刻，并且可以连接有粘性末端或者平末端的 DNA 片段，但对于单链核酸无活性，主要用于限制性内切酶酶切产物 DNA 片段克隆、基因定点突变与 PCR 产物克隆、线性 DNA 自环化与修复双链 DNA 缺刻。T4 DNA Ligase (Fast) 需要 ATP 作为辅助因子，在室温下完成粘性末端连接反应仅需 10 min。

### 酶活单位定义

37 °C 条件下，1 Weiss unit 的酶在 20 min 内催化 1 nmol 的 [<sup>32</sup>PPi] 转变为活性炭吸附态。1 Weiss unit 等同于约 200 个粘性末端连接反应单位 (CEU)，相当于在 16°C 条件下，30 min 内连接 50% HindIII 消化后的 λDNA 片段。

### 酶活检测条件

酶活在如下反应混合物中进行测试：66 mM Tris-HCl (pH 7.6)，6.6 mM MgCl<sub>2</sub>，66 μM ATP，10 mM DTT，3.3 μM [<sup>32</sup>PPi]。

### 质量控制

#### 核酸内切酶残留检测

将 5 U 的 T4 DNA Ligase (Fast) 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 在 37°C 下，共同温育 4 h 后，使用琼脂糖凝胶电泳检测，少于 10% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

#### 核酸外切酶残留检测

将 5 U 的 T4 DNA Ligase (Fast) 与 15 ng 双链 DNA 片段在 37°C 温育 16 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测双链 DNA 底物无变化。

#### 蓝白斑测试

室温条件下，使用 5 U T4 DNA Ligase (Fast) 连接 pUC57 DNA/HindIII, pUC57 DNA/PstI 或 pUC57 DNA/SmaI 消化产物 1 h，然后用 E.coli XL1-Blue 感受态细胞转化连接产物，检测到少于 1% 的白斑。

### 使用方法

#### 1. DNA 插入片段连接至载体 DNA (粘性末端连接)

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
线性化载体 DNA	20~100 ng
插入片段 DNA	3:1~10:1 (片段:载体摩尔比)
10× T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
T4 DNA Ligase (Fast)	1 U
Nuclease-Free Water	To 20 μl

② 充分混匀并瞬离，22°C温育 10 min；

③ 取 1~5 μl 的连接产物用于 50 μl 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2 μl 用于 50 μl 电转感受态细胞的转化。

注：如果连接反应产物用于电转化，应使用离心柱或者氯仿抽提清洁 DNA 代替热失活步骤。

#### 2. DNA 插入片段连接至载体 DNA (平末端连接)

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
线性化载体 DNA	20~100 ng
插入片段 DNA	3:1~10:1 (片段:载体摩尔比)
10× T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
50% PEG	2 μl
T4 DNA Ligase (Fast)	5 U
Nuclease-Free Water	To 20 μl

② 充分混匀并瞬离，22°C温育 1 h；

③ 取 1~5 μl 的连接产物用于 50 μl 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2 μl 用于 50 μl 电转感受态细胞的转化。

注：如果连接反应产物用于电转化，应使用离心柱或者氯仿抽提清洁 DNA 代替热失活步骤。

### 3. 线性 DNA 自环化

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
线性化 DNA	10~50 ng
10×T4 DNA Ligase Buffer	5 μl
T4 DNA Ligase (Fast)	5 U
Nuclease-Free Water	To 50 μl

② 彻底混匀并瞬离，22°C温育10 min；

③ 取1~5 μl的连接产物用于50 μl化学感受态细胞的转化，或者取1~2 μl用于50 μl电转感受态细胞的转化。

**注：如果连接反应产物用于电转化，应使用离心柱或者氯仿抽提清洁DNA代替热失活步骤。**

### 注意事项

1. T4 DNA Ligase (Fast) 在浓度高于200 mM的NaCl或KCl中会被强烈抑制；
2. 连接反应液添加量不应该超过感受态细胞体积的10%，不推荐体系中加入过量的T4 DNA Ligase (Fast)；
3. 与T4 DNA Ligase (Fast)结合的DNA可能会在琼脂糖凝胶中出现带移或弥散，为了避免此现象，可以在上样前对酶进行热失活，必要时加入适量的SDS；
4. 聚乙二醇(PEG)能极大地提高平末端连接的连接效率，PEG 8000的推荐添加量是连接体系的5% (w/v)；
5. 电转化效率可能通过对T4 DNA Ligase (Fast)热失活或者使用离心柱或者氯仿抽提纯化DNA方式来提高；
6. 转化子数目可通过延长反应时间至1 h而增加。

### 4. 接头连接

双链寡核苷酸接头经常被用于在插入片段上产生粘性末端。接头通常包含限制酶识别位点，在连接后经酶切处理产生和克隆载体匹配的粘端。有时候接头已包含与克隆载体匹配的粘端，此时无需在接头连接完成后进行插入片段的进一步处理。

① 于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
线性化 DNA	100~500 ng
磷酸化接头	1~2 μg
10×T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
50% PEG	2 μl
T4 DNA Ligase (Fast)	2 U
Nuclease-Free Water	To 20 μl

② 彻底混匀并瞬离，22°C温育10 min；

③ 在65°C作用10 min或者70°C作用5 min，进行热失活。

**注1：**添加1 mM ATP的条件下，T4 DNA Ligase (Fast)在CutOne®酶切缓冲液中具有100%的活力。因此，接头连接反应时可以在CutOne®酶切缓冲液中进行，以简化“接头连接-酶切”实验流程。具体方法为：向接头连接体系中添加ATP至终浓度1 mM，接头连接反应完成后，先失活T4 DNA Ligase (Fast)。然后，再在体系中加入适量的LightNing®快速内切酶，最后使用最适酶切反应温度进行温育即可。

**注2：**CutOne®酶切缓冲液中不含ATP组分，百时美为您提供独立包装的100mM ATP母液（货号EG21916），敬请选购！