

版本号: NG170117

TIANSeq T4 DNA Ligase (Rapid)

T4 DNA连接酶 (快速)

目录号: NG201

产品内容

产品组成	NG201-01	NG201-02
T4 DNA Ligase (600 U/ μ l)	24,000 U	240,000 U
5 \times Rapid Ligation Buffer	500 μ l	2 \times 1 ml
10 \times Ligation Buffer	200 μ l	2 \times 1 ml

储存条件

-25 $^{\circ}$ C~-15 $^{\circ}$ C 保存。保质期: 一年。

产品简介

T4 DNA Ligase 在ATP作为辅助的情况下，可以特异性催化双链DNA或者双链RNA的5'磷酸和3'羟基之间形成磷酸二酯键。本产品对与粘性末端和平末端的双链核酸片段均有较高的连接活性，同时，对于双链DNA，双链RNA或者DNA-RNA杂交链中的缺刻（Nick）也有修复作用。

但是本产品无法催化单链核酸之间的连接。

产品特点

酶活性高：酶比活性高，反应重复性好。

连接快速：10 min即可完成连接反应，省时省力。

适用性广：无论是粘性末端还是平末端，本产品均有较高的连接活性；无论是DNA连接还是RNA连接，本产品都有很好的适用性。

适用范围

1. 在二代测序（NGS）应用中，主要用于文库构建过程中的接头连接；
2. DNA片段与载体连接；
3. 其他需要进行双链核酸连接的实验。

产品来源

重组*E. coli*菌株,含有从T4噬菌体中克隆的连接酶基因。蛋白分子量大小约为：55.3 kDa。

活性单位

在1×DNA Ligase Buffer反应液中，在50 μl反应体系下，23°C、30 min内使100 ng粘性末端双链DNA片段连接50%时所需要的酶量定义为1个活性单位（U）。

使用示例

使用之前需要将T4 DNA Ligase (600 U/ μ l) 置于冰上备用；5 \times Rapid Ligation Buffer或10 \times Ligation Buffer解冻后，混匀，简短离心后置于冰上备用。

在NGS文库构建过程中

在NGS文库构建过程中，一般使用5 \times Rapid Ligation Buffer，按终浓度15~30 U/ μ l的量加入T4 DNA Ligase。也可根据实验具体情况来调整用量。

反应条件：20~25 $^{\circ}$ C，15 min。

连接结束以后一般通过磁珠进行产物纯化。

在载体构建过程中

1. 按下表所示配制连接体系。

组分	体积 (μ l)
5 \times Rapid Ligation Buffer或 10 \times Ligation Buffer	1 \times
载体DNA	1~10 ng/ μ l
DNA片段	1~10 ng/ μ l
T4 DNA Ligase (600 U/ μ l)	0.5~1 μ l
ddH ₂ O	补足至20 μ l

注意：载体DNA和连接片段的摩尔比：对于不同的载体和DNA片段，要取得成功的连接，应分别建立具有不同摩尔数比例的连接反应。在大多数情况下，DNA片段的摩尔数应控制在载体DNA摩尔数的3~10倍。

- 将上表中反应体系混匀，并简短离心，连接反应条件根据所选Buffer的不同而有所不同；如果选择5 \times Rapid Ligation Buffer，则反应条件为25 $^{\circ}$ C，10 min；如果选用10 \times Ligation Buffer，则反应条件为16 $^{\circ}$ C，10~12 h。
 - 取0.1~10 ng连接产物进行感受态细胞转化。
-

酶蛋白性质描述

性质	蛋白描述
蛋白纯度	>95%
酶活性	300,000 U/mg
核酸外切酶	6000 U酶中, <1.0%
核酸内切酶	6000 U酶中, 未检出
宿主基因组污染	6000 U酶中, <10拷贝

注意事项: 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- 5×Rapid Ligation Buffer中含ATP, 为避免ATP的降解, 建议解冻后的5×Rapid Ligation Buffer分装成小包装并在-20℃保存。
- 平末端的载体与DNA片断连接时, 应首先对载体进行去磷酸化, 以防止载体自身环化。
- 5×Rapid Ligation Buffer中含有PEG, 在后续感受态细胞转化过程中, PEG的存在会抑制电转感受态细胞的转化效果, 为提高此操作的成功性, 可按下面两种方法来进行: (1) 通过核酸纯化试剂盒对连接产物纯化后再进行转化操作; (2) 利用ddH₂O或者TE溶液对连接产物稀释10~100倍。稀释时需要注意的是要尽量保证用于转化的DNA连接产物量落在0.1~10 ng之间。

酶保存液成分

10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50%甘油, pH 7.5 @ 25℃。

5×Rapid Ligation Buffer成分

132 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 2 mM ATP, 15% PEG 6000, pH 7.6 @ 25℃。
