

产品目录号：
M1801
M1804
M1794

T4 DNA 连接酶（经蓝白克隆验证）

简明操作步骤



注意：这是节选操作步骤，详细英文说明书见 <http://www.promega.com/tbs/9pim180/9pim180.html>，本简明操作步骤电子版见 www.promega.com.cn

组份号	规格（weiss 单位）
M180A	100
M180B	500
M179A	500(高浓度)

连接酶缓冲液, 10X (C126A, C126B): 随酶提供的 10X 连接酶缓冲液组分是: 300mM Tris-HCl (pH 7.8), 100mM MgCl₂, 100mM DTT 和 10mM ATP。缓冲液的性能取决于 ATP 的质量。把缓冲液分装成小份储存于-20°C 以将 ATP 和 DTT 的降解降到最低。

注意: 10X 连接酶缓冲液中的 DTT 经冷冻后可能形成沉淀。如果出现沉淀, 将混合缓冲液震荡混合直到沉淀溶解 (通常 1-2 分钟)。沉淀溶解后, 本产品的性能不受影响。

酶储存液: T4 DNA 连接酶保存于 10mM Tris-HCl (pH 7.0), 50mM KCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA 和 50% 甘油中。

来源: 表达重组克隆的 *E. coli*。

单位定义: 在 16°C, 20 分钟内催化连接 95% 以上的 *Hind* III 酶切的 1μg Lambda DNA 的片段所需要的酶量定义为 0.01 Weiss 单位。单位浓度请查看产品信息标签。

储存温度: 储存于-20°C。避免反复冻融和频繁温度变化。参考产品信息标签上的过期日期。



T4 DNA 连接酶简明操作步骤

I. 描述

T4 DNA 连接酶催化双链 DNA 相邻核苷酸的 5'-磷酸和 3'-羟基之间的连接，平端和粘端都可被连接。本酶也能催化 RNA 连接到 DNA 或者双链 RNA 上，但不催化单链核酸的连接。

II. 标准应用

A. 连接 DNA

请使用者准备:

- 无核酸酶的水 (目录号 P1193)

我们推荐在把一个片段克隆到质粒载体时,采用 1:1, 1:3 或 3:1 的载体:插入片段摩尔比。这些比例可能不适其它类型的载体,例如 cDNA 和基因组克隆载体。以下例子说明 3.0kb 质粒和 0.5kb DNA 插入片段的摩尔比如何转换成质量比:

$$\frac{(\text{载体质量 ng} \times \text{插入片段 kb})}{\text{载体大小 kb}} \times \frac{\text{插入片段}}{\text{载体}} = \text{的摩尔比}$$

= 插入片段 ng

举例: :

如果连接反应中有 3kb 的载体有 100ng, 应加入多少 0.5kb 的插入片段 DNA? 假设载体:插入片段比例为 1:3。

$$\frac{(100\text{ng 载体} \times 0.5\text{kb 插入片段})}{3\text{kb 载体}} \times \frac{3}{1}$$

=50ng 插入片段

以下 3kb 载体和 0.5kb 插入片段 DNA 的连接反应使用 1:1 载体:插入片段比例。典型的连接反应使用 100-200ng 载体 DNA。

1. 在一个无菌小离心管中建立下列反应体系: :

载体 DNA	100ng
插入片段 DNA	17ng
连接酶 10X 缓冲液	1μl
T4 DNA 连接酶 (Weiss 单位)	0.1-1u
无核酸酶水加至	10ul

2. 孵育反应于: :
室温下 3 小时, 或
4° C 过夜, 或
15° C, 4-18 小时。

注意:

1. 在一系列温度和连接时间条件下, 连接都能成功。最适连接温度是 T4 DNA 连接酶的最适反应温度 (25°C) 和保证片段末端退火所需要的温度之间的平衡, 由于片段长度、末端碱基组成不同, 退火温度也会不同。短双链 (少于 16 个碱基的接头) 因自身融解温度 (T_m) 低需要的连接温度也较低。通常, 低温连接需要较长的孵育时间。连接条件的可变性从文献中能反映出来。平端连接一般在 15-20°C 进行 4-18 小时效果好, 而粘端在室温(22°C) 3 小时或 4-8°C 过夜就能有效连接。
2. 本操作步骤给出的连接条件基于 Promega 质控用的 lambda 载体粘端连接。这些条件的研究使用了 Promega 的 T4 DNA 连接酶 (经蓝白克隆验证)。
3. 在连接反应中添加聚乙二醇(PEG)能促进平端片段连接。但由于 PEG 质量不一, 而且克隆 cDNA 时 PEG 能引起 lambda 自我连接, 所以我们不推荐连接反应使用 PEG。

III. 其他信息

分子量: 68kDa。

催化条件: Mg²⁺, ATP 和 DTT。Mg²⁺ 最佳浓度是 10mM。Mn²⁺可以替换 Mg²⁺ 但效率只有 Mg²⁺ 的 25%。

抑制: 大于 150mM NaCl 抑制 50% (切口处测定活性)。

其他抑制有: 0.2M K⁺, Cs⁺, Li⁺, NH₄⁺ 和 1mM 精胺。

失活: 70°C 加热 10 分钟。