

T4 DNA 连接酶说明书

Cat#: 8054013

【产品名称】

T4 DNA 连接酶

【包装规格】

成品名称	成品货号	规格	组分货号	组分名称	组分规格	数量
T4 DNA 连接酶	8054013	1000 units	8054013-1	T4 DNA 连接酶 (5 units/ μ l)	1000 units	1 支
			8054013-2	10 \times Buffer	1 mL	5 支

注：1 unit=1 Weiss unit

【产品简介】

T4 DNA 连接酶由携带 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、修复双链 DNA 缺刻与线性 DNA 自环化。T4 DNA 连接酶需要 ATP 作为辅助因子，在室温下完成粘性末端连接反应仅需 10 分钟。

【储运条件】

-25 $^{\circ}$ C~-15 $^{\circ}$ C保存，有效期 24 个月。

蓝冰运输。

【酶活单位定义】

37 $^{\circ}$ C条件下，1 Weiss unit 的酶在 20 min 内催化 1 nmol 的 [32 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 $^{\circ}$ C条件下，30 min 内连接 50% HindIII 消化后的 λ DNA 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 MgCl₂，0.066 mM ATP，10 mM DTT，3.3 μ M [32 PPi]。

【质量控制】

核酸内切酶残留测试

37 $^{\circ}$ C条件下，将 200 units 的 T4 DNA 连接酶与 1 μ g 的 pUC19 DNA 中温育 4 h，未检测出由共价闭合环状 DNA 转变为带有缺刻的 DNA。

核酸外切酶残留测试

将酶液与双链 DNA 底物在 37 $^{\circ}$ C温育 16 h，通过 DNA 电泳检测双链 DNA 底物无变化。

蓝白斑测试

室温条件下，使用 30 units T4 DNA 连接酶连接 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 在冰上按如下建议的加样顺序配制反应体系：

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× Buffer	2 μL
T4 DNA 连接酶	1 unit
Nuclease-Free Water	To 20 μL

② 充分混匀并瞬时离心，22°C温育 10min；

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 在冰上按如下建议的加样顺序配制反应体系：

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× Buffer	2 μL
50% PEG	2 μL
T4 DNA 连接酶	5 units
Nuclease-Free Water	To 20 μL

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 充分混匀并瞬时离心，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。

3. 线性 DNA 自环化

① 在冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
线性化 DNA	10~50 ng
10× Buffer	5 μL
T4 DNA 连接酶	5 units
Nuclease-Free Water	To 50 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。

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 在冰上按如下建议的加样顺序配制反应体系：

试剂	使用量
线性化 DNA	100~500 ng
磷酸化接头	1~2 μg
10 \times Buffer	2 μL
50% PEG	2 μL
T4 DNA 连接酶	2 units
Nuclease-Free Water	To 20 μL

② 充分混匀并瞬离，22°C温育 10min；









③ 在 65°C作用 10 min 或者 70°C作用 5 min，进行热失活。

注：添加 1 mM ATP 的条件下，T4 DNA 连接酶在 SuperCut 酶切缓冲液中具有 100%的活力。因此，接头连接反应时可以在 SuperCut 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：接头连接反应完成后，先失活 T4 DNA 连接酶，然后向该体系中添加 ATP 至终浓度 1 mM，再在体系中加入适量的 SuperCut 快速内切酶，最后使用最适酶切反应温度进行温育即可。

【注意事项】

1. T4 DNA 连接酶在浓度高于 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 连接酶；
3. 与 T4 DNA 连接酶结合的 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 连接酶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。

【产品标签符号说明】

产品标签符号	说明	产品标签符号	说明
	产品编号		批次代码
	生产日期		制造商
	有效期		温度极限
	避光保存		查阅使用说明

【说明书修改日期】

2024.04.24

【公司信息】

生产企业：北京行健雅生物技术有限公司（该产品由深圳市达科为生物工程有限公司监制）

网址： www.dakewe.com

电话： 010-57794997

邮箱： xing_jianya@dakewe.net

地址：北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地华佗路 50 号院 1 号楼 301