

# ExCell Bio

## T4 DNA Ligase (T4 DNA连接酶)

### User Manual

Catalog Number    MB000-5391  
                                 MB000-5392  
                                 MB000-5393  
                                 MB000-5394



## 产品概述

本酶催化相邻DNA链的5'-P末端和3'-OH末端以磷酸二酯键结合的反应, 需要ATP作辅酶。本酶不仅可以催化粘性末端之间或平滑末端之间的连接, 也可以催化DNA与RNA之间及少数RNA之间的连接。

含有 T4 噬菌体的 gp30 DNA 连接酶全长基因的重组表达载体, 经 *E.coli* 重组表达纯化制成, 分子量为 57KDa, N 端含有 6 个 His。

## 技术参数

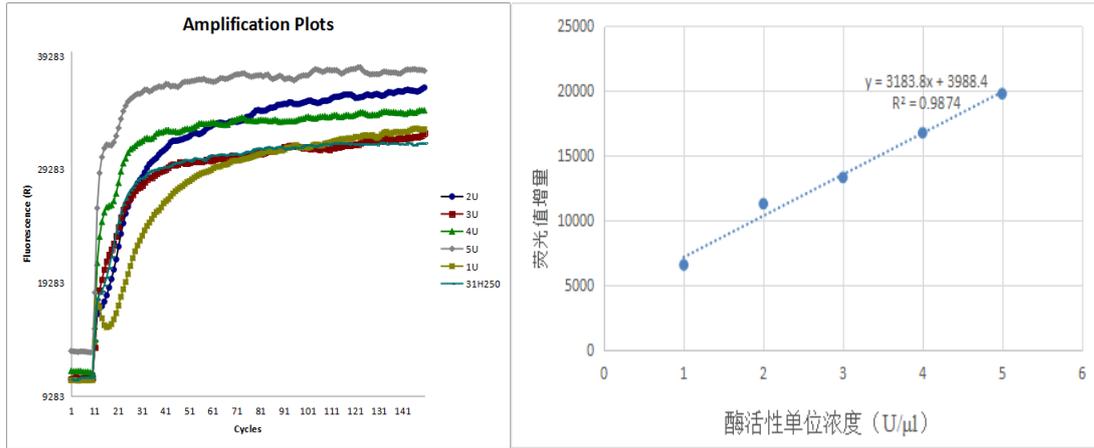
储存溶液	10 mM Tris-H Cl(pH7.5 @ 25°C), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50%Glycerol。
核酸内切酶活性	在 50 $\mu$ l 反应体系中, 2000 U 的本酶和 1 $\mu$ g 的 $\Phi$ X174 RFI 型 DNA 在 37°C 下温浴 4 小时后, 电泳显示小于 10% 的 RFI 型 DNA 变为 RFII 型。
纯度	经过 SDS-PAGE 和考马氏亮蓝染色, 灰度扫描分析, 纯度大于 95%。
核酸外切酶活性	在 50 $\mu$ l 反应体系中, 2000U 的本酶和 1 $\mu$ g $\lambda$ DNA-Hind III 在 37°C 下温浴 4 小时后, DNA 的电泳谱带没有明显的涂抹和降解现象。
RNase 酶残留	在 50 $\mu$ l 反应体系中, 2000U 的本酶和 1 $\mu$ g 16S,23S rRNA 在 37°C 下温浴 4 小时后, RNA 的电泳谱带没有明显的降解现象。
大肠杆菌基因组残留	1 $\mu$ l 酶液中含有的大肠杆菌基因组残留拷贝数小于 1 个拷贝。
活性单位浓度	活性单位浓度为 400,000 U/ml。

## 活性分析

为粘性末端连接单位, 在 20  $\mu$ l 连接反应体系中, 5'末端 DNA 浓度为 0.12  $\mu$ M (300  $\mu$ g/ml) 的条件下, 16°C 反应 30 分钟时, 能使 50%  $\lambda$ DNA-Hind III 分解物连接所需的酶量定义为 1 个活性单位(unit)。

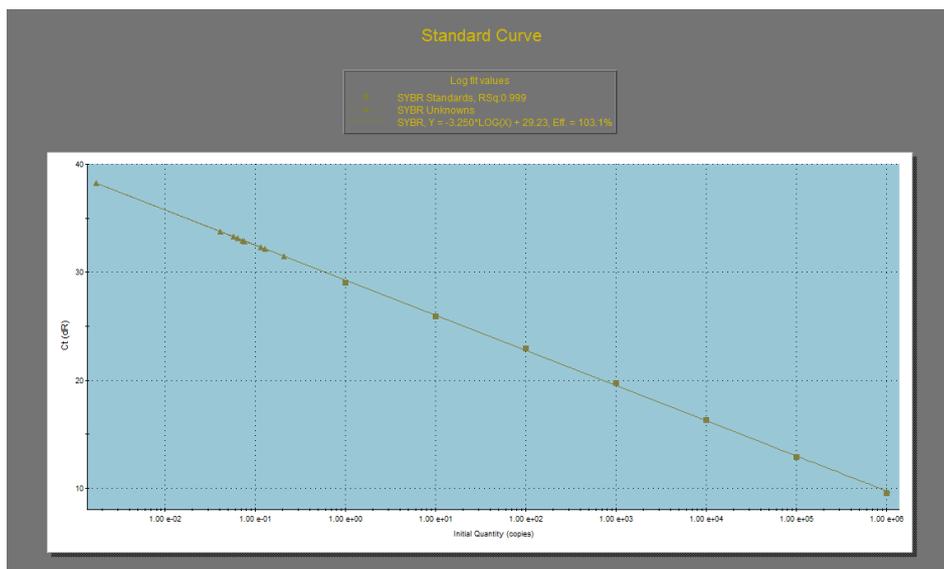
## 相关数据

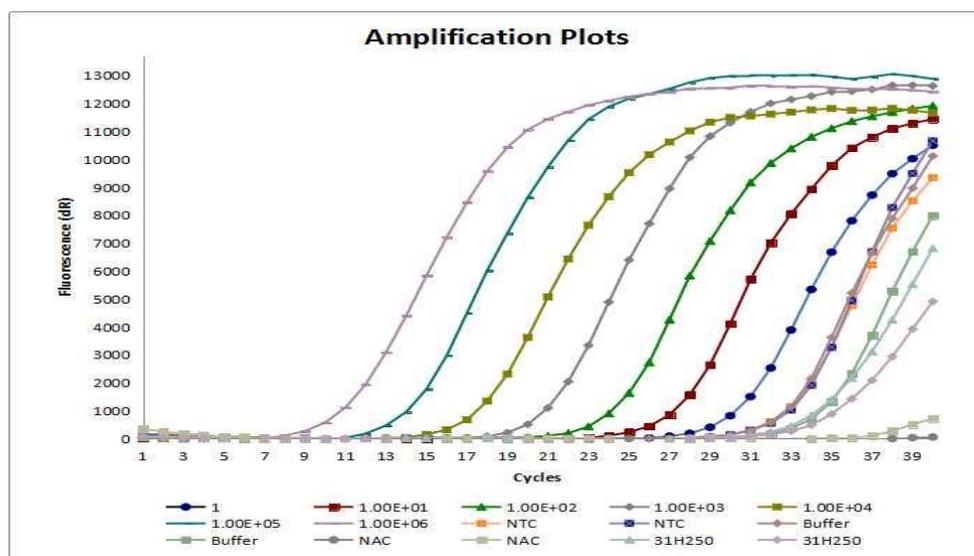
### 1. 活力测定



采用分子信标方法，将国外著名品牌公司的 T4 DNA 连接酶做系列稀释，在反应体系中加入 1-5 U 的酶，在反应的起始阶段其荧光增量与酶量呈现出线性关系，本公司生产的酶与国外著名品牌公司的酶比活力相当。

## 2. 大肠杆菌基因组残留测定





	CT (dR) 重复 1	CT (dR) 重复 2	拷贝数
空白对照 (DDH2O)	31.44	31.52	0.203
阴性对照 (Universal Buffer)	31.50	33.17	0.131
阳性对照 (国外公司产品)	40.00	38.65	0.001
样品 (批号: 31H250 )	35.45	36.47	0.059

采用 QPCR 方法, E.coli 基因组 DNA (gDNA) 做系列稀释, 做标准曲线, 测量成品中 1 $\mu$ l 酶液中含有的大肠杆菌基因组残留拷贝数, 根据 CT 与拷贝数的关系, 得出 1 $\mu$ l 酶液中含有的大肠杆菌基因组残留拷贝数小于 1 个拷贝。

## 产品应用

粘性末端或平末端的连接与载体的连接;

双链寡聚核苷酸接头与双链DNA的连接;

位点特异性突变;

双链DNA,RNA或RNA-DNA复合体中缺口的修复;

连接酶介导的RNA检测。

## 产品规格

	货号	规格
1	MB000-5391	10,000 U
2	MB000-5392	20,000 U
3	MB000-5393	100,000 U
4	MB000-5394	400,000 U

## 产品组分及储存条件

货号	规格	组分		
		T4 DNA Ligase	2× Rapid Ligase Buffer	10×Universal Ligase Buffer
MB000-5391	10,000 U	1 管	0.2 mlx2 管	0.2 mlx1 管
MB000-5392	20,000 U	1 管	0.5 mlx1 管	0.5 mlx1 管
MB000-5393	100,000 U	1 管	1.0 mlx3 管	1.0 mlx1 管
MB000-5394	400,000 U	1 管	5.0mlx 2 管	1.0mlx 2 管

-20°C条件下运输和保存。

## 1 实验流程

快速连接反应可以在（16 °C-25 °C）下用Rapid Ligase Buffer进行；粘性末端连接：20 μl反应体系中加入1μlT4 DNA Ligase反应10-30 min；平滑末端连接：20 μl反应体系加入1μl T4 DNA Ligase反应2 h。

普通连接反应条件为用10×Universal Ligase Buffer 16°C过夜连接。

2×Rapid Ligase Buffer: 100 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub> , 2 mM ATP, 2 mM DTT, 15% PEG 8000, pH 7.5 @ 25°C。

10×Universal Ligase Buffer: 500 mM Tris-HCl, 100 m M MgCl<sub>2</sub> , 10 m M ATP, 100 mM DTT, pH 7.5 @ 25°C。



## 注意事项

---

1. *E.coli* DNA Ligase 需要 NAD 作辅因子,而 T4 DNA 连接酶的辅因子是 ATP。
2. 使用含 50%甘油的 T4 DNA Ligase 贮存液稀释 T4 DNA Ligase, 稀释后应保存在-20°C; 如果使用 1×Universal Ligase Buffer 做稀释液, 稀释后要立即用于连接反应, 否则随着温度的升高和/或时间的延长, 酶的连接活性会逐渐降低。
3. 当反应体系中 NaCl 或 KCl 的浓度超过 200 m M 时,可强烈抑制本酶活性; 65°C 加热 10 分钟或 70°C 加热 5 分钟可以灭活此酶。