

Instant T4 DNA Ligase

产品编号	产品名称	包装
D7009S	Instant T4 DNA Ligase	40kU
D7009M	Instant T4 DNA Ligase	200kU

产品简介:

- 碧云天研发的Instant T4 DNA Ligase, 即超快速T4 DNA连接酶, 是T4 DNA连接酶的升级版, 可以快速高效催化粘端或平端双链DNA或RNA的5'-P末端和3'-OH末端之间以磷酸二酯键结合, 该催化反应需ATP作为辅助因子。同时Instant T4 DNA Ligase可以修补双链DNA、双链RNA或DNA/RNA杂合双链中的单链缺刻(single-strand nicks)。
- **用途:** Instant T4 DNA Ligase常用于DNA片段和载体、linker或adaptor等的连接。也可用于缺刻修复及Ligase介导的RNA检测。
- **来源:** 本Instant T4 DNA Ligase由大肠杆菌表达, 表达基因为T4嗜菌体T4 DNA Ligase基因的突变体。
- **活性定义:** One unit is defined as the amount of enzyme required to give 50% ligation of HindIII fragments of λ DNA in 30min at 16°C in 20 μ l of the assay mixture containing 50mM Tris, pH7.5, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, 25 μ g/ml BSA and a 5'-DNA termini concentration of 0.12 μ M (300 μ g/ml)。200U等于1个Weiss unit, 以Weiss unit计, 本产品的包装分别为200U和1000U。
- Instant T4 DNA Ligase和T4 DNA Ligase分别进行平末端连接后, 连接产物转化感受态细胞后涂板获得的LB平板的实测效果和菌落PCR鉴定结果参考图1。

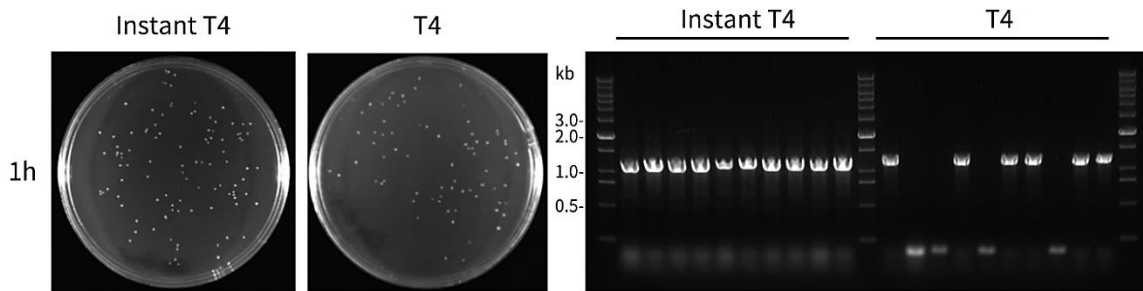


图1. 碧云天Instant T4 DNA Ligase (D7009)和T4 DNA Ligase (D7006/D7008)的平末端连接实测效果图。如图所示, 左侧为将Instant T4 DNA Ligase和T4 DNA Ligase分别用于平端连接后转化DH5 α 感受态细胞后涂板获得的LB平板的实测效果图, 右侧为菌落PCR鉴定的结果。在20 μ l反应体系中, 将SmaI单酶切线性化并用D7028 Antarctic Phosphatase (Thermosensitive)去除末端磷酸根的载体pUC18, 与PCR扩增的1100bp双平端DNA片段混合(载体与DNA片段的摩尔比为1:3), 然后加入2 μ l的10X Ligation Buffer, 0.5 μ l的Instant T4 DNA Ligase或T4 DNA Ligase, 并用水补足至20 μ l, 分别在16°C孵育1h后, 取10 μ l转化到100 μ l的DH5 α 感受态细胞中。实验结果表明, Instant T4 DNA Ligase连接1小时得到的克隆数相当, Instant T4 DNA Ligase连接1h的阳性率可达100%, 而T4 DNA Ligase连接1h的阳性率约为60%。菌落PCR引物为M13 forward sequencing primer (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')和M13 reverse sequencing primer (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')。实际检测效果会因实验条件的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- **纯度:** 不含DNA内切酶、外切酶和磷酸酯酶, 不含RNA酶, 满足常规连接反应要求。
- **酶储存溶液:** 20mM Tris, pH7.5, 50mM KCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA and 50% (v/v) glycerol。
- **10X Ligation Buffer:** 400mM Tris, pH7.8, 100mM MgCl₂, 100mM DTT, 10mM ATP。
- **失活或抑制:** 65°C孵育10min可以导致Instant T4 DNA Ligase失活; NaCl或KCl浓度大于200mM时会强烈抑制Instant T4 DNA Ligase。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7009S-1	Instant T4 DNA Ligase (1kU/ μ l)	40 μ l
D7009S-2	10X Ligation Buffer	200 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7009M-1	Instant T4 DNA Ligase (1kU/μl)	200μl
D7009M-2	10X Ligation Buffer	1ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 至少一年有效。

注意事项:

- 对于普通的转化大肠杆菌的操作, 不必对连接产物进行纯化, 连接产物可以直接用于转化。但用电转方法转化大肠杆菌时, 通常宜先用DNA纯化试剂盒或酚氯仿抽提方法等纯化DNA, 然后再进行电转。
- 需快速连接时, 推荐使用碧云天的超快速DNA连接试剂盒(D7001)或快速DNA连接试剂盒(D7002/D7003)。
- 普通连接反应不必进行凝胶电泳观察。如果需要对于连接产物进行凝胶电泳观察, 推荐先在65°C孵育10min使Instant T4 DNA Ligase失活, 以避免Instant T4 DNA Ligase和DNA结合导致的条带位置迁移(Band shift)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. PCR产物或酶切片段和普通载体的连接:

- 取1-2μg载体酶切过夜, 或至少酶切3-5h以上。尽量确保酶切充分, 否则后续会导致产生很多自连的克隆。
注: 如果载体进行的是单酶切, 请务必进行去磷酸化处理, 推荐使用碧云天的Antarctic Phosphatase (Thermosensitive) (D7028)或BeyoAP Alkaline Phosphatase (D7027), 避免后续产生很多自连的克隆。
- 载体酶切或去磷酸化处理完毕后, 可以使用试剂盒进行纯化, 例如碧云天的BeyoMag™磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒(D0041)或PCR纯化试剂盒/DNA纯化试剂盒(D0033)。也可以采用常规的酚氯仿抽提乙醇沉淀方法纯化载体。对于酶切产生较大片段(大于50-60bp)的情况推荐采用切胶回收的方式。
- 对于PCR产物: PCR产物凝胶电泳后, 切胶回收预期大小的DNA片段。凝胶中DNA片段的回收可以使用试剂盒进行操作, 例如碧云天的BeyoMag™磁珠法DNA凝胶回收试剂盒(D0043)或DNA凝胶回收试剂盒(D0056)。也可以采用反复冻融等方法回收DNA片段。
- 对于回收的PCR产物或其它需酶切的DNA片段, 用适当内切酶酶切, 随后纯化酶切产物。
注: 这一步的酶切不必酶切特别充分, 通常酶切效率能达到80-90%以上即可。即本步骤的酶切通常酶切1-2小时即可。酶切产物可使用试剂盒进行纯化, 例如碧云天的BeyoMag™磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒(D0041)或PCR纯化试剂盒/DNA纯化试剂盒(D0033)。也可以采用常规的酚氯仿抽提乙醇沉淀方法纯化。
- 取约25-100ng经过酶切和纯化的载体, 加入3倍摩尔数的待插入片段。参考下表设置连接反应体系。
注1: 很多时候由于载体量和待插入片段的量都比较少, 在回收后很难定量。此时可以根据回收前电泳条带的亮度进行大致的估计。通常以DNA分子量标准的某一条带为参考, 估计或通过灰度半定量目的条带和该参考条带的亮度的比例关系。然后再按照预计的纯化或凝胶回收时的得率计算出最终得到的载体量和待插入片段量的比例关系。超纯水推荐使用碧云天的ST876 BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)。
注2: 通常每个反应使用0.2-0.5μl连接酶已经足够, 如果希望进一步提高连接效率, 可以把连接酶的用量提高至1μl。

Reagent	Amount
Vector	50-100ng
Insert	3:1 (mole ratio) VS Vector
10X Ligation Buffer	2μl
Ultrapure Water	To 20μl
Instant T4 DNA Ligase	0.2-0.5μl
Total volume	~20μl

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底。
- 16°C孵育1-18h, 或20-25°C孵育连接1-2h。
注1: 同时兼容双平端和双粘端DNA片段连接。
注2: 通常16°C孵育1-4h即可以获得较好的连接效果。
- 随后即可直接取连接产物用于转化感受态细菌。

2. PCR产物和T载体的连接:

- PCR产物凝胶电泳后, 切胶回收预期大小的DNA片段。凝胶中DNA片段的回收可以使用例如碧云天的BeyoMag™磁珠法DNA凝胶回收试剂盒(D0043)或DNA凝胶回收试剂盒(D0056)等试剂盒, 也可以采用反复冻融等方法回收DNA片段。
- 按照T载体的说明书取适量T载体, 加入3倍摩尔数的待插入片段。参考下表设置连接反应体系。
注1: 很多时候由于载体量和PCR产物的量都比较少, 在回收后很难定量。此时可以根据回收前电泳条带的亮度进行大致的估计。通常以DNA分子量标准的某一条带为参考, 估计或通过灰度半定量目的条带和该参考条带的亮度的比例关系。然后再按照预计的纯化或凝胶回收时的得率计算出最终得到的载体量和PCR产物的量的比例关系。

注2: 通常每个反应使用0.2-0.5 μ l连接酶已经足够, 如果希望进一步提高连接效率, 可以把连接酶的用量提高至1 μ l。

Reagent	Amount
T vector	As recommended
Insert	3:1 (mole ratio) VS Vector
10X Ligation Buffer	2 μ l
Ultrapure Water	To 20 μ l
Instant T4 DNA Ligase	0.2-0.5 μ l
Total volume	~20 μ l

- c. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底。
- d. 16 $^{\circ}$ C孵育1-18h, 或20-25 $^{\circ}$ C孵育连接1-2h。

注: 通常16 $^{\circ}$ C孵育1-4h即可以获得较好的连接效果。

- e. 随后即可直接取连接产物用于转化感受态细菌。

3. Linker或miRNA/RNAi/ sgRNA等小RNA表达用DNA片段和载体的连接:

- a. 载体的酶切和纯化同步步骤1a和1b。
- b. Linker或miRNA、RNAi、sgRNA等小RNA表达用DNA片段的退火可以选择适当的DNA退火缓冲液, 例如碧云天的Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (D0251), 进行退火反应。
- c. 长度大于8bp的Linker或退火的小RNA表达用DNA片段, 可以按照5:1至10:1的比例和载体进行连接反应。例如载体为0.03 μ mol, 则插入片段可以为0.15至0.3 μ mol。长度小于8bp的linker, 比例需调整为10:1以上。
- d. 除插入片段的用量外, 随后按照步骤1e-1h进行。

4. DNA自身环化的连接:

参考步骤1e, 待插入片段换成适量的水即可。其余步骤按照步骤1f-1h进行。

5. 其它类型的DNA片段连接参考上述方法进行。

常见问题:

1. 连接反应后转化效率很低或阳性克隆非常少:

- a. 可能感受态细菌转化效率太低, 用质粒作为阳性对照同时检测感受态的转化效率。
- b. 可以尝试提高载体或插入片段的纯度, 也可以考虑适当提高载体或插入片段的用量。对于平端连接需注意适当延长连接时间。
- c. 可能载体酶切不够充分, 用未经连接的载体转化作为阴性对照。
- d. 用存放DNA的溶液进行转化, 作为阴性对照, 检测感受态细菌是否存在问题。

相关产品

产品编号	产品名称	包装
D7001S	超快速DNA连接试剂盒	100次
D7001M	超快速DNA连接试剂盒	500次
D7002	快速DNA连接试剂盒	100次
D7003	快速DNA连接试剂盒	500次
D7006	T4 DNA Ligase	40,000U
D7008	T4 DNA Ligase	200,000U
D7018S	PBCV-1 DNA Ligase	1250U
D7018M	PBCV-1 DNA Ligase	5kU
D7018L	PBCV-1 DNA Ligase	25kU
D7028S	Antarctic Phosphatase (Thermosensitive)	1000U
D7028M	Antarctic Phosphatase (Thermosensitive)	5000U
D7010S	Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒)	20次
D7010M	Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒)	100次
D0033	PCR纯化试剂盒/DNA纯化试剂盒	50次
D0056	DNA凝胶回收试剂盒	50次
D0041S	BeyoMag TM 磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒	50次
D0041M	BeyoMag TM 磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒	200次
D0043S	BeyoMag TM 磁珠法DNA凝胶回收试剂盒	50次
D0043M	BeyoMag TM 磁珠法DNA凝胶回收试剂盒	200次