使用前请仔细阅读说明书版本号：202201

Fast T4 DNA Ligase(Fast)

目录号：EZ22045S　　规格：200T　　保存：-20℃保存及运输，有效期至少一年。

产品简介：

Fast T4 DNA Ligase(Fast)由携带 T4 噬菌体 gene30 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、线性 DNA 自环化与修复双链 DNA 缺刻。Fast T4 DNA Ligase(Fast)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。

酶活单位定义：

37℃条件下，1Weiss unit 的酶在 20min 内催化 1nmol 的[^{32}PPi]转变为活性炭吸附态。1Weiss unit 等同于约 200 个粘性末端连接反应单位（CEU），相当于在 16℃条件下，30min 内连接 50%HindIII 消化后的λDNA 片段。

酶活检测条件：

酶活检测条件

酶活在如下反应混合物中进行测试：66mM Tris-HCl(pH7.6)，6.6mM $MgCl_2$，66μM ATP，10mM DTT，3.3μM [^{32}PPi]。

试剂内容：

组分	规格
T4 DNA Ligase(Fast) (5U/μl)	200μL
10× T4 DNA Ligase Buffer	1mL
50%PEG	1mL

注：1U=1 Weiss unit

质量控制：

核酸内切酶残留检测

37℃条件下，将 200U 的 T4 DNA Ligase(Fast)与 1μg 的 pUC19 DNA 中温育 4h，未检测出由共价闭合环状 DNA 转变为带有缺刻的 DNA。

核酸外切酶残留检测

将酶液与双链 DNA 底物在 37℃温育 16h，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 30U T4 DNA Ligase 连接 pUC57 DNA/HindIII，pUC57 DNA/PstI 或 pUC57 DNA/SmaI 消化产物 1h，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于冰上配制如下反应体系：

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× T4 DNA Ligase Buffer	2μl
T4 DNA Ligase (Fast)	1U (0.2μl)
Nuclease-Free Water	To20μl

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充分混匀并瞬离，22℃温育 10min；

③取 1~5μl 的连接产物用于 50μl 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2μl 用于 50μl 电转感受态细胞的转化；

2. DNA 插入片段连接至载体 DNA（平末端连接）

①于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
线性化载体 DNA	20~100ng
插入片段 DNA	3:1~10:1(片段：载体摩尔比)
10× T4 DNA Ligase Buffer	2μl
50% PEG	2μl
T4 DNA Ligase(Fast)	5U(1μl)
Nuclease-Free Water	To20μl

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充分混匀并瞬离，22℃温育 1h；

③取 1~5μl 的连接产物用于 50μl 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2μl 用于 50μl 电转感受态细胞的转化。

3. 线性 DNA 自环化

①于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
线性化 DNA	10~50ng
10× T4 DNA Ligase Buffer	5μl
T4 DNA Ligase(Fast)	5U(1μl)
Nuclease-Free Water	To50μl

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充分混匀并瞬离，22℃温育 10min；

③取 1~5μl 的连接产物用于 50μl 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2μl 用于 50μl 电转感受态细胞的转化。

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于冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量
线性化载体 DNA	100~500ng
磷酸化接头	1-2μl

10× T4 DNA Ligase Buffer	2μl
50% PEG	2μl
T4 DNA Ligase(Fast)	2U(0.4μl)
Nuclease-Free Water	To20μl

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

②彻底混匀并瞬离，22℃温育 10min；

③在 65℃作用 10min 或者 70℃作用 5min，进行热失活。

注意事项

1. T4 DNA Ligase 在浓度高于 200mM 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 Ligase；
3. 与 T4 DNA Ligase 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 Ligase 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 1h 而增加。