

T4 DNA Ligase (Rapid)

使用说明书 (Ver.0.0.1)

产品特点

- ◇ 连接快速：10min 即可完成连接反应，省时省力。
- ◇ 酶活性高：反应重复性好。
- ◇ 适用性广：无论是粘性末端还是平末端，本产品均有较高的连接活性。

产品货号：

JSR-E-104 (600,000U)



扫描二维码了解更多产品信息

目录 Contents

产品组份	1
产品特性	1
操作步骤	1
✧ DNA 片段和载体 DNA 的连接	1
✧ DNA 文库构建中接头连接反应	2
组件查询	2

产品组份

试剂盒组成	600,000U	保存
T4 DNA Ligase (Rapid) (600U/μl)	1ml	-20°C
5xRapid Ligase Buffer	5x1ml	-20°C
10xLigase Buffer	2x1ml	-20°C

产品特性

- ✧ T4 DNA Ligase 催化双链 DNA 或 RNA 上相邻的 5'-磷酸末端和 3'-羟基末端形成磷酸二酯键。
- ✧ 该酶不仅能够催化平齐末端或粘性末端之间的连接，还可以修复双链 DNA。
- ✧ 质粒 DNA 大小：最高可达 200kb。（片段长度不同与菌种相关）
- ✧ RNA 或 DNA/RNA 杂交双链中的单链切割。

操作步骤

DNA 片段和载体 DNA 的连接

1. 配制如下连接反应体系：

名称	体积 (μL)
DNase/RNase-FreeH ₂ O	upto10μL
10×LigaseBuffer	1μL
插入片段	片段与载体的分子摩尔比应在 3:1-10:1
载体 DNA	50-100ng
T4DNALigase (Rapid) (600U/μl)	1μL

2. 16°C连接 10-12h。
3. 转化：
 - 1) 将连接产物加入到 100μl 感受态细胞中（连接产物的体积不应超过感受态细胞体积的 1/10），轻轻弹匀，冰上孵育 30min。
 - 2) 将离心管置于 42°C 水浴，热激 90sec（不要晃动），立刻置于冰水浴中，静置 2-3min。
 - 3) 向离心管中加入 900μl LB 或 SOC 培养基，150rpm，37°C 振荡培养 45min，使菌体复苏，抗性基因表达。
 - 4) 5,000rpm (2,500xg) 离心 5min，去掉 900μl 上清。用剩余培养基将菌体重悬，用无菌涂布棒在含有正确抗性的平板上轻轻涂匀。室温正置 10min。待菌液被平板吸收后，37°C 倒置培养过夜。

- 加 14ml 预冷过的溶液 P3，温和地上下翻转 8 次或者更多次，直到中和完全后，会出现白色絮状沉淀。（中和物应蓬松均匀，无黏性团状等状态，中和完全后溶液呈现黄色），在 $\geq 5000 \times g$ 离心力下离心 5 分钟。

DNA 文库构建中接头连接反应

- 配制如下连接反应体系：

表 1: AdapterLigation 体系

名称	体积 (μL)
DNase/RNase-Free H_2O	upto50 μL
5×RapidLigaseBuffer	10 μL
dA-Tailing 产物	30 μL
DNAAdapter	2.5 μL
T4DNALigase (Rapid) (600U/ μl)	2.5 μL

接头用量参考表 2

Adapter 的质量和浓度直接影响连接效率及文库产量。Adapter 用量过高可能会产生较多 AdapterDimer；用量较低可能会影响连接效率及文库产量。表 2 列举了使用本试剂盒，不同 InputDNA 量推荐的 Adapter 使用量。

表 2: 500pg-1 μg InputDNA 推荐的 Adapter 使用浓度

InputDNA	Adapter:InputDNA 摩尔比	InputDNA	Adapter:InputDNA 摩尔比
1 μg	10:1	50ng	100:1
500ng	20:1	25ng	100:1
250ng	40:1	1ng	200:1
100ng	100:1	500pg	400:1

注：InputDNA 摩尔数 (pmol) \approx InputDNA 质量 (ng) /0.66×InputDNA 平均长度 (bp)。

- 用移液器轻轻吹打混匀，瞬离后置于 PCR 仪中 25°C，反应 10min 即可。反应结束后，立即进行后续反应。

组件查询

产品	货号	规格	保存
T4 DNA Ligase (Rapid) (600U/ μl)	JSR-E-104-A	1ml	-20°C
5xRapid Ligase Buffer	JSR-E-104-B	5x1ml	-20°C
10xLigase Buffer	JSR-E-104-C	2x1ml	-20°C