

Technical literature is available at: www.mesgenbio.com. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com



产品用途

1. DNA片段和载体DNA的连接。
2. DNA片段和Linker或Adaptor DNA的连接。

产品简介

T4 DNA Ligase可催化dsDNA平末端或粘性末端相邻核酸的5' 磷酸末端和3' 羟基末端形成磷酸二酯键，还可催化RNA和双链中的ssDNA或RNA链连接，但不催化全单链核苷酸连接。适用于标记 RNA 3'-末端，环化RNA和DNA寡聚核苷酸以及克隆cDNA等操作。

产品组成

组分	体积
10 × Ligase Buffer	1ml
T4 DNA Ligase (400 U/μl)	100μl

活力单位定义

在20μl的连接反应体系中，6μg的λDNA-HindⅢ的分解物在16°C下反应30分钟时，有50%以上的DNA片段被连接所需要的酶量定义为1个活性单位 (U)。

操作办法

1. 在微量离心管中配制连接反应体系：

组分	体积
10 × Ligase Buffer	1μl
插入片段	0.3 pmol
载体DNA	0.03 pmol
T4 DNA Ligase (400 U/μl)	1μl
超纯水	补足至10μl

注：插入片段与载体的摩尔比应在3:1 ~ 10:1之间；平末端载体与DNA片段进行连接，应先将载体去磷酸化处理，以防自身环化。

2. 16°C过夜反应。

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1/6），轻轻弹匀，冰上孵育30分钟。
- 2) 将离心管置于42°C水浴，不要晃动，准确热激90秒后，立刻置于冰水浴中，静置2-3分钟。
- 3) 向离心管中加入900μl LB或SOC培养基，150 rpm, 37°C振荡培养45分钟，使菌体复苏，抗性基因表达。
- 4) 2,500g离心5分钟，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10分钟。待菌液被平板吸收后，37°C倒置培养过夜。

保存条件

-20° C

仅供研究，不得用于临床诊断