

MonClone™ Fast T4 DNA Ligase V2

REF: MC00102

储运条件

-20°C

产品组成

组分 / 规格	MC00102S	MC00102M
MonClone™ Fast T4 DNA Ligase V2 (5 U/μl)	40 μl	200 μl
MonClone™ 10× T4 DNA Ligase Buffer	1 ml	2×1 ml
50% PEG	1 ml	1 ml

⚠ 注：1 U=1 Weiss unit

产品简介

MonClone™ Fast T4 DNA Ligase V2 由携带 T4 噬菌体 gene 30 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、修复双链 DNA 缺刻与线性 DNA 自环化。Fast T4 DNA Ligase V2 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°C条件下，1 Weiss unit 的酶在 20 min 内催化 1 nmol 的 [³²P]Pi 转变为活性炭吸附态。1 Weiss unit 等同于约 200 个粘性末端连接反应单位 (CEU)，相当于在 16°C条件下，30 min 内连接 50% HindIII 消化后的 λDNA 片段。

酶活检测条件

酶活在如下反应混合物中进行测试：66 mM Tris-HCl (pH 7.6)，6.6 mM MgCl₂，0.066 mM ATP，10 mM DTT，3.3 μM [³²P]Pi。

质量控制

核酸内切酶残留测试

37°C条件下，将 200 U 的 MonClone™ Fast T4 DNA Ligase V2 与 1 μg 的 pUC19 DNA 中温育 4 h，未检测出由共价闭环环状 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°C 温育 16 h，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 30 U T4 DNA Ligase V2 连接 pUC57 DNA/HindIII，pUC57 DNA/PstI 及 pUC57 DNA/SmaI 消化产物 1 h，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	1:1~5:1（片段：载体摩尔比）
10× T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
MonClone™ Fast T4 DNA Ligase V2	1 U (0.2 μl)
Nuclease-Free Water	To 20 μl

② 充分混匀并瞬离，22°C 温育 10 min；

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

⚠ 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. 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	20~100 ng
插入片段 DNA	1:1~5:1（片段：载体摩尔比）
10× T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
50% PEG	2 μl
MonClone™ Fast T4 DNA Ligase V2	5 U (1 μl)
Nuclease-Free Water	To 20 μl

② 充分混匀并瞬离，22°C 温育 1 h；

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

⚠ 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。

☎ 400-928-3698

莫纳生物科技有限公司
Monad Biotech Co., Ltd.

Tel: +86-(0)21-64868889
Fax: +86-(0)21-64868669

E-mail: support@monadbiotech.com
www.monadbiotech.com

最终解释权所有 © 莫纳生物科技有限公司，保留一切权利



Simply Discover More

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	10~50 ng
10× T4 DNA Ligase Buffer	5 µl
MonClone™ Fast T4 DNA Ligase V2	5 U (1 µl)
Nuclease-Free Water	To 50 µl

- ② 彻底混匀并瞬离，22℃温育 10 min；
- ③ 取 1~5 µl 的连接产物用于 50 µl 化学感受态细胞的转化，或者取 1~2 µl 用于 50 µl 电转感受态细胞的转化。
- ⚠ 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。

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 DNA	100~500 ng
磷酸化接头	1~2 µg
10× T4 DNA Ligase Buffer	2 µl
50% PEG	2 µl
MonClone™ Fast T4 DNA Ligase V2	2 U (0.4 µl)
Nuclease-Free Water	To 20 µl

- ② 彻底混匀并瞬离，22℃温育 10 min；
- ③ 在 65℃作用 10 min 或者 70℃作用 5 min，进行热失活。
- ⚠ 注：添加 0.5 mM ATP 的条件下，MonClone™ Fast T4 DNA Ligase V2 在莫纳 FlashOne™ 酶切缓冲液中具有 100% 的活力。因此，接头连接反应时可以在 FlashOne™ 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：接头连接反应完成后，先失活 T4 DNA Ligase V2，然后向该体系中添加 ATP 至终浓度 0.5 mM，再在体系中加入适量的 FlashCut™ 快速内切酶，最后使用最适酶切反应温度进行温育即可。

注意事项

1. T4 DNA Ligase 在浓度高于 200 mM 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 V2；
3. 与 T4 DNA Ligase V2 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 4000 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 V2 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 1 h 而增加。

