

T4 DNA连接酶及快速连接系统简明操作指导

注意：这是简明操作步骤，详细产品说明及注意事项请参考英文说明书www.promega.com/protocols/

适用产品：适用于 T4 DNA Ligase 普通连接系统(M1801、M1804、M1794)或 LigaFast™ Rapid DNA Ligation System 快速连接系统(M8221、M8225)

I. 说明：T4 DNA Ligase (T4 DNA 连接酶) 用于催化粘性末端或平末端两条 DNA 链的相邻核苷酸的 5'-磷酸基和 3'-OH 的连接。该酶也可催化 RNA 与双链 DNA 或 RNA 的连接，但不能使单链核酸相连。

Promega T4 DNA 连接酶提供普通连接和快速连接两种不同的试剂盒：

普通连接 (4°C 孵育过夜)		
名称	货号	规格
T4 DNA Ligase	M1801	100 U
	M1804	500 U
DNA Ligase (HC)	M1794	500 U

快速连接系统 (室温孵育, 粘性末端5min, 平末端15min)		
名称	货号	规格
LigaFast™ Rapid DNA Ligation System	M8221	30 reactions
	M8225	150 reactions

II. 需自备的材料：无核酸酶水 (Cat.# P1193, P1195)

III. 操作步骤：

1. 计算载体和插入片段的用量 (以质粒和DNA片段连接反应为例)

将纯化的 PCR 产物片段克隆到质粒载体时，我们推荐插入片段:载体按照 2:1 的摩尔比例 (载体:插入片段的比例可在 1:3 到 3:1 范围内调整以得到最佳的结果) 进行。首次实验建议每反应体系加入 100ng 载体 (载体的用量可在 100ng-200ng 范围内调整，以得到最佳的结果)，并按照下面的公式计算插入片段的加入量：

$$\frac{\text{载体量 (ng)} \times \text{插入片段长度 (kb)}}{\text{载体长度 (kb)}} \times \frac{\text{插入片段}}{\text{载体}} \text{ 摩尔比} = \text{插入片段 (ng)}$$

2. 根据采用的是普通连接试剂盒还是快速连接试剂盒进入下面操作过程中的一种：

普通连接 (M1801、M1804、M1794)：

2.1 按下表配制反应体系，反复吹打混匀：

普通连接体系	加入量	加入体积
载体 DNA	100ng	__μl
插入片段 DNA	__ng	__μl
Ligase 10X Buffer	1μl	1μl
T4 DNA Ligase (Weiss units)	0.1-1 U	__μl
加入无核酸酶水至终体积 (10μl)		__μl

2.2 反应体系在4°C孵育过夜，连接完成后用于细菌转化。

注：

- T4 DNA 连接酶的用量可在 0.1-1U 范围内调整；
- 孵育条件也可尝试 15°C孵育4-18hr或室温(22°C)孵育 3hr。

快速连接系统 (M8221、M8225)：

2.1 按下表配制反应体系，反复吹打混匀：

快速连接系统体系	加入量	加入体积
载体 DNA	100ng	__μl
插入片段 DNA	__ng	__μl
2X Rapid Ligation Buffer	5μl	5μl
T4 DNA Ligase (Weiss units)	3 U	__μl
加入无核酸酶水至终体积 (10μl)		__μl

2.2 室温(25°C)孵育，粘性末端连接孵育5min，平末端连接孵育 15min。连接完成后直接用于细菌转化。