

Fast T4 DNA Ligase

货号: B102

保存条件: -20 °C

产品介绍:

本品中的Fast T4 DNA Ligase能催化dsDNA或者RNA的5'-磷酸末端和3'-羟基形成磷酸二酯键, 该酶催化平滑末端或粘性末端DNA的连接, 修复双链DNA, RNA, DNA/RNA 杂交链中的单链切口。本品中Fast T4 DNA Ligase和2 × Fast Reaction Buffer经过了精心优化, 能实现室温下5分钟快速连接反应。

产品组成:

组分	B102-01	B102-02
Fast T4 DNA Ligase	100 μL	400 μL
2 × Fast Reaction Buffer	1 mL	4 mL

产品使用:

A. 粘性末端连接/平末端连接

2 × Fast Reaction Buffer请混匀放置冰上备用, 按照以下顺序加样, 并使用移液器轻柔混匀:

线性化载体	20 - 100 ng ^{**}
插入片段	1倍-5倍摩尔量 (相对于载体摩尔量) [§]
2 × Fast Reaction Buffer	10 μL
Fast T4 DNA Ligase	1 μL
ddH ₂ O	补足至20 μL

^{**} 线性化载体pmol = [(X ng ÷ 长度) × 1.5]。

例如 100ng 的5000 bp载体pmol = [(100 ng ÷ 5000 bp) × 1.5] = 0.03 pmol。

[§] 插入片段ng = [(插入片段长度 ÷ 载体长度) × 载体的ng × 摩尔倍数1-5]。

例如800 bp片段插入5000 bp载体, 线性化载体量为100 ng, 插入片段ng = [(800 bp ÷ 5000 bp) × 100 ng × 5倍] = 80 ng。

B. 连接反应条件

室温(25°C) 孵育5分钟, 反应后-20°C存储或者放置冰上用于转化。

C. 连接产物转化

(使用化学感受态可参照以下步骤, 或以使用的感受态说明书为准)

- C.1 在冰上解冻克隆感受态细胞, 取10 μl连接产物加入到100 μl感受态细胞中, 轻弹管壁混匀, 冰上静置30 min(连接产物不要超过感受态体积的1/10)。
- C.2 42°C水浴热激45秒, 立即冰上冷却2-3分钟。加900 μl SOC或LB培养基(不添加抗生素), 37°C摇菌1小时(转速200 - 250 rpm)。
- C.3 将相应抗性的LB平板固体培养基在37°C培养箱中预热。5,000 rpm离心5 min, 弃掉900 μl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。
- C.4 37°C培养箱中倒置培养12-16 h。