

## *E. coli* DNA Ligase

产品编号	产品名称	包装
D7016S	<i>E. coli</i> DNA Ligase	200U
D7016M	<i>E. coli</i> DNA Ligase	1KU
D7016L	<i>E. coli</i> DNA Ligase	5KU

### 产品简介:

- 碧云天生产的*E. coli* DNA Ligase, 即大肠杆菌DNA连接酶, 由碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的重组酶。*E. coli* DNA Ligase是一种以NAD<sup>+</sup> (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)为辅酶, Mg<sup>2+</sup>依赖的, 催化双链DNA中5'磷酸和3'羟基之间形成磷酸二酯键, 即催化双链DNA粘性末端连接或双链DNA中的缺刻修复的DNA连接酶[1]。
- *E. coli* DNA Ligase可催化双链DNA相邻粘性末端5'磷酸和3'羟基磷酸二酯键的形成, 但常规条件下不能进行平末端双链DNA的连接。在添加10-15% PEG和适当高浓度的单价阳离子时, 也可以催化平末端双链DNA的连接反应。*E. coli* DNA Ligase在一定温度范围内(4-37°C)均具有活性, 同时可以被热失活(65°C孵育20分钟)。
- 碧云天生产的*E. coli* DNA Ligase连接粘性末端双链线性DNA的效果请参考图1:

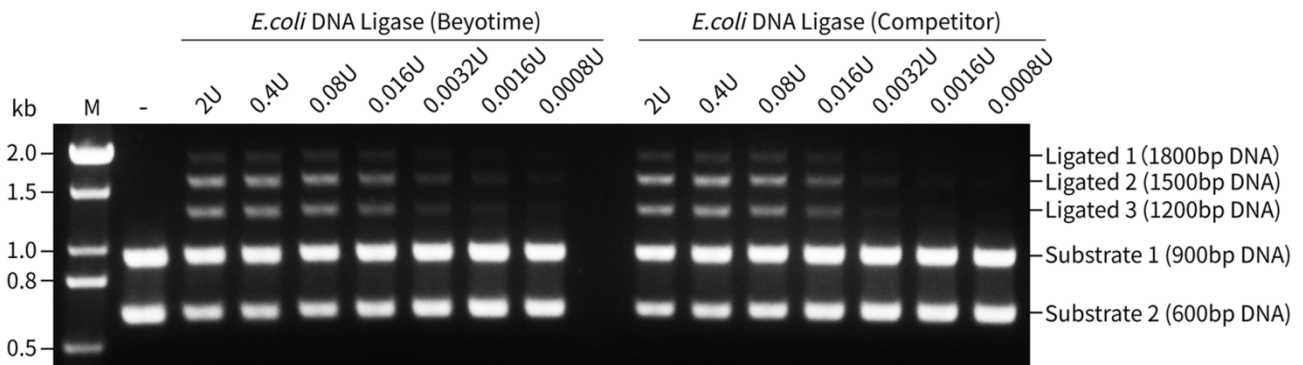


图1. 碧云天生产的*E. coli* DNA Ligase连接粘性末端双链线性DNA的效果图。利用碧云天生产的BeyoFusion™ DNA Polymerase (D7220), 使用两端带有Hind III酶切位点的引物对靶基因进行PCR扩增, 生成两种不同长度的两端带有Hind III酶切位点的平末端双链线性DNA分子(900bp和600bp), 随后使用碧云天Hind III (D6389)对PCR产物进行酶切, 获得两端带有互补粘性末端的双链线性DNA分子, 分别作为Substrate 1 (900bp)和Substrate 2 (600bp); 在20μl反应体系(30mM Tris-HCl, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 26μM NAD, 50μg/ml BSA, pH8.0 @25°C)中, 分别加入400ng经PCR扩增及Hind III酶切产生的两种双链DNA片段, 以及图中指定量的本产品或N公司(Competitor)的*E. coli* DNA Ligase, 16°C孵育30分钟进行连接, 然后65°C孵育20分钟以终止反应。取出10μl反应产物, 加入2μl 6X DNA Loading Buffer (D0071), 然后进行2%琼脂糖凝胶电泳检测。如图所示, 本产品与N公司的产品相比, 具有相当的连接粘性末端双链线性DNA的效果。实际操作时不同实验条件获得的实验结果会略有差异, 图中所示结果仅供参考。

- **用途:** 粘性末端双链DNA分子的连接; 双链DNA的缺刻修复; cDNA第二链合成后的克隆[2]。
- **来源:** 纯化自携带编码*E. coli* DNA ligase的*E. coli*重组菌株。
- **活性定义:** One unit is defined as the amount of enzyme required to give 50% ligation of HindIII fragments of λ DNA (5' DNA termini concentration of 0.12μM, 300μg/ml) in a total reaction volume of 20μl in 30 minutes at 16°C in 1X *E. coli* DNA Ligase Reaction Buffer。
- **纯度:** 不含除*E. coli* DNA Ligase之外的其它种类的DNA连接酶, 不含内切酶和外切酶, 不含RNA酶, 不含磷酸酯酶。
- **酶储存液:** 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 200μg/ml BSA, 50% Glycerol (pH7.4 @25°C)。
- **10X Reaction Buffer:** 300mM Tris-HCl, 40mM MgCl<sub>2</sub>, 260μM NAD, 10mM DTT, 500μg/ml BSA (pH8.0 @25°C)。
- **失活或抑制:** 65°C孵育20分钟可使*E. coli* DNA Ligase失活。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7016S-1	<i>E. coli</i> DNA Ligase (10U/μl)	20μl
D7016S-2	10X Reaction Buffer	100μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7016M-1	<i>E. coli</i> DNA Ligase (10U/μl)	100μl
D7016M-2	10X Reaction Buffer	500μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7016L-1	<i>E. coli</i> DNA Ligase (10U/μl)	500μl
D7016L-2	10X Reaction Buffer	2ml
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20°C保存, 两年有效。10X Reaction Buffer建议长期保存于-80°C, 以延长NAD半衰期。

### 注意事项:

- *E. coli* DNA Ligase需要以NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 作为辅酶, 而不是像T4 DNA连接酶等以ATP为辅酶。
- *E. coli* DNA Ligase对于平末端片段的连接效率是极低的, 对于平末端的连接建议使用T4 DNA Ligase。
- *E. coli* DNA Ligase的催化底物是双链DNA分子, 不能用于单链DNA或RNA的连接反应。
- *E. coli* DNA Ligase连接反应需要以NAD作为辅助因子, 10X Reaction Buffer中含有辅助因子NAD, 因此10X Reaction Buffer建议长期保存于-80°C, 以延长NAD半衰期。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明:

1. 参考下表在冰浴中配制反应体系(以20μl体系为例):

Reagent	Volume	Final Concentration
dsDNA	xμl	up to 0.25μg/μl
10X Reaction Buffer	2μl	1X
<i>E. coli</i> DNA Ligase (10U/μl)	1μl	0.5U/μl
Nuclease-free Water	(17-x)μl	-
Total Volume	20μl	-

**注1:** 如果同时进行多个反应, 可把上表中除底物DNA之外的所有组分预先混合, 然后再分装到各反应管。

**注2:** *E. coli* DNA Ligase使用时宜存放在冰盒内或冰浴上。

2. 轻轻震荡混匀或移液器反复吹打混匀, 随后低速离心以使粘附在管壁上的液体沉淀至管底。
3. 反应条件: 16°C孵育30-60分钟。
4. 终止反应: 反应结束后立即将反应产物在65°C条件下孵育20分钟, 以终止反应。
5. 将反应后的产物进行琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺电泳, 拍照观察并分析连接效果。如果需要从琼脂糖凝胶中回收DNA样品, 推荐使用D0056 DNA凝胶回收试剂盒; 如果需要从酶切消化反应体系中纯化DNA样品, 推荐使用D0033 PCR纯化试剂盒/DNA纯化试剂盒。
6. 其他用途请自行参考*E. coli* DNA Ligase的相关文献资料进行。

### 常见问题:

1. *E. coli* DNA Ligase和T4 DNA Ligase有什么区别?  
在推荐的使用条件下, *E. coli* DNA Ligase不能连接平末端DNA或RNA分子[3]。
2. *E. coli* DNA Ligase能否被热失活?  
可以。将*E. coli* DNA Ligase在65°C条件下孵育20分钟, 即可使其完全失活。
3. 应该选用哪种连接酶或连接试剂盒?  
如果需要平末端或粘性末端的快速连接, 建议使用快速DNA连接试剂盒(D7002/D7003)。T4 DNA Ligase (D7006/D7008)是大多数DNA重组反应所选用的酶, 可用于粘性末端(室温10分钟连接)或平末端(室温2小时或过夜)的连接。*E. coli* DNA Ligase对底物的选择比T4 DNA Ligase更具有特异性, 如果只需要粘性末端的连接, 抑制平末端或RNA分子的连接, 建议使用*E. coli* DNA Ligase。如果实验目的是单链DNA或RNA分子的连接, 建议使用T4 RNA Ligase (D7021)。

### 参考文献:

1. Lehman IR. Science. 1974. 186(4166):790-7.
2. Okayama H and Berg P. Mol Cell Biol. 1982. 2(2):161-70.
3. Higgins NP and Cozzarelli NR. Methods Enzymol. 1979. 68:50-71.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D0071	DNA上样缓冲液(6X)	2ml
D0072	BeyoRed DNA上样缓冲液(6X)	2ml
D0107	DNA Ladder (0.1-10kb, 21 bands)	100次
D0109	DNA Ladder (0.1-10 kb, 21 bands, with BeyoRed)	100次
D0110	DNA Ladder (0.2-12kb, 12 bands)	100次
D0111	DNA Ladder (0.2-12kb, 12 bands, with BeyoRed)	100次
D0161S	BeyoGel™琼脂糖预制胶(1%, NA-Red, TAE, 8孔)	10块
D0163S	BeyoGel™琼脂糖预制胶(2%, NA-Red, TAE, 8孔)	10块
D7016S	<i>E. coli</i> DNA Ligase	200U
D7016M	<i>E. coli</i> DNA Ligase	1KU
D7016L	<i>E. coli</i> DNA Ligase	5KU
D6952S	牛痘DNA拓扑异构酶I	200U
D6952M	牛痘DNA拓扑异构酶I	1KU
D6952L	牛痘DNA拓扑异构酶I	5KU
D7002FT	快速DNA连接试剂盒 (试用装)	10次
D7002	快速DNA连接试剂盒	100次
D7003	快速DNA连接试剂盒	500次
D7006	T4 DNA Ligase	40KU
D7008	T4 DNA Ligase	200KU
D7010FT	Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒, 试用装)	5次
D7010S	Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒)	20次
D7010M	Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒)	100次
D7018S	PBCV-1 DNA Ligase	1250U
D7018M	PBCV-1 DNA Ligase	5KU
D7018L	PBCV-1 DNA Ligase	25KU
D7021	T4 RNA Ligase	200U
R0056-2ml	PEG8000 (50%, RNase free)	2ml
R0700S	小RNA3' 接头(5'腺苷化, 3'封闭及连接)试剂盒	20次
R0702S	Universal miRNA Cloning Linker (5'腺苷化3'封闭)	1μg
R0702M	Universal miRNA Cloning Linker (5'腺苷化3'封闭)	5μg
R0621S	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase)	1KU
R0621M	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase)	5KU
R0632S	T4 RNA Ligase 2 (dsRNA Ligase)	1KU
R0635S	T4 RNA Ligase 2, truncated	5KU
R0635M	T4 RNA Ligase 2, truncated	20KU
R0635L	T4 RNA Ligase 2, truncated	100KU
SF1136-10mM	SCR7 (DNA ligase IV抑制剂)	10mM×0.2ml
SF1136-5mg	SCR7 (DNA ligase IV抑制剂)	5mg
SF1136-25mg	SCR7 (DNA ligase IV抑制剂)	25mg

Version 2022.01.26