

# Ultra T4 DNA Ligase

REF: EG25208S

## 储存条件

-20℃保存 2 年

## 产品组成

组分	规格
Ultra T4 DNA Ligase (5 U/μl)	200 μl
10× T4 DNA Ligase Buffer <sup>a</sup>	1 ml
50% PEG	1 ml

a. Buffer 融化时，出现少量沉淀属正常现象，请待溶液恢复至室温，震荡混匀后使用。

## 产品简介

Ultra T4 DNA Ligase 是 T4 DNA Ligase 的耐热突变体，催化双链 DNA 或 RNA 之间的 5'-磷酸基团和 3'-羟基之间形成磷酸二酯键，与 T4 DNA Ligase 相比大幅度提高了热稳定性，最高可耐受至 50℃，从而提高了它在 Golden Gate Assembly 中的连接效率。Ultra T4 DNA Ligase 不仅能够连接平末端和粘性末端，还可以修补双链 DNA 和一些 DNA/RNA 杂交链中的单链切口。与 T4 DNA Ligase 一致，Ultra T4 DNA Ligase 也需要 ATP 作为辅助因子。

## 酶活定义

37℃ 条件下，1 Weiss unit 的酶在 20 min 内催化 1 nmol 的 [PPi] 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℃ 条件下，30 min 内连接 50% HindIII 消化后的 λDNA 片段。

## 失活条件

65℃，10 min。

## 产品应用

1. 酶切克隆；
2. NGS 测序；
3. dsDNA 或 DNA/RNA 杂合体中的单链缺口修复。

## 质量控制

### 蛋白纯度

经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测，蛋白纯度不低于 95%。

### 非特异性内切酶活性

37℃ 下，在 20 μl 反应体系中将 5 U Ultra T4 DNA Ligase 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，少于 20% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

### DNase 活性

37℃ 下，在 20 μl 反应体系中将 5 U Ultra T4 DNA Ligase 与 15 ng 双链 DNA 片段共同温育 16 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，双链 DNA 片段无变化。

### RNase 活性

37℃ 下，在 10 μl 反应体系中将 5 U Ultra T4 DNA Ligase 与 500 ng RNA 共同温育 1 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，超过 90% 的 RNA 保持完整。

### 蓝白斑测试

22℃ 条件下，使用 5 U Ultra T4 DNA Ligase 连接 pUC19 DNA/HindIII，pUC19 DNA/PstI，pUC19 DNA/SmaI 消化产物 1 h，然后用 Mach1-T1 *E. coli* 感受态细胞转化连接产物，检测到少于 1% 的白斑。

### 宿主 DNA 残留

采用中国药典 2025 版四部通则 3407 外源性 DNA 残留量测定法第三法定量 PCR 法，本品中大肠杆菌宿主细胞 DNA 残留量不超过 1 拷贝 /5 U。

## 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	3:1~10:1 (片段：载体摩尔比)
10× T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
Ultra T4 DNA Ligase	1 μl
Nuclease-Free Water	To 20 μl

② 充分混匀并孵育，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。

### 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	3:1~10:1 (片段：载体摩尔比)
10× T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
50% PEG	2 μl
Ultra T4 DNA Ligase	1 μl
Nuclease-Free Water	To 20 μl

② 充分混匀并孵育，22℃ 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。

## 注意事项

1. 虽然本产品可耐受高温至 50°C，但不推荐在高温进行常规的酶切连接反应，会由于 DNA 末端无法充分互补配对导致连接效率大幅度下降。
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 Ultra T4 DNA Ligase；
3. 与 Ultra T4 DNA Ligase 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 8000 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 Ultra T4 DNA Ligase 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。