1. ОПИСАНИЕ

Рекомбинантный фермент, полученный в клетках *E. coli* (источник гена – фаг T4). T4 ДНК лигаза восстанавливает целостность двуцепочечных нуклеиновых кислот, соединяя 5′-фосфатный и 3′-гидроксильный концы.

2. ПРОТОКОЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

КЛАССИЧЕСКОЕ КЛОНИРОВАНИЕ ПО ТИПУ "РЕСТРИКЦИЯ - ЛИГИРОВАНИЕ"

1. Приготовить следующую реакционную смесь: 20–100 нг линейного вектора ДНК, вставка ДНК: в мольном соотношении 1:1 до 5:1 по отношению к вектору, 2 мкл 10X реакционного буфера T4 ДНК лигазы, 1 мкл T4 ДНК лигазы, вода без нуклеаз: до 20 мкл общего объёма реакции.

2. Инкубировать 10 минут при 22°C для лигирования липких концов и 1 час при 22°C для тупых концов.

3. Использовать до 5 мкл смеси для трансформации 50 мкл химически компетентных клеток или 1–2 мкл на 50 мкл электрокомпетентных клеток.

КЛОНИРОВАНИЕ ПО ТЕХНОЛОГИИ GOLDEN GATE

1. Для клонирования потребуется: 50 фмоль акцепторной плазмидной ДНК, 100 фмоль каждой вставки в виде плазмиды или ПЦР-продукта, 2 мкл 10X реакционного буфера T4 ДНК лигазы, 1 мкл лигазы, 1 мкл рестриктазы (например, BsaI или другой подходящий фермент), Вода без нуклеаз: до 20 мкл общего объёма реакции.

2. Предварительная рестрикция: 37°C – 10 минут.

3. 30 циклов: [37°C (рестрикция) – 1:30 мин], [16°C (лигирование) – 3 мин].

4. Финальная рестрикция 37°C – 15 минут.

5. Инактивация рестриктазы 50°C – 5 мин.

6. Инактивация лигазы 80°C – 5 мин.

3. СОВЕТЫ ОТ R&D ОТДЕЛА

- Для работы фермента обязательно требуется АТФ, который входит в состав нашего реакционного буфера.
- Активность лигазы полностью исчезает при содержании NaCl или KCl более 200 мМ. Учитывайте это, если вносите ДНК напрямую после рестрикции.
- Активность блокируется при содержании ЭДТА более 50 мМ, так как фермент зависит от ионов магния.
- Способна лигировать ДНК по тупым концам

4. СПЕЦИФИКАЦИЯ НАБОРА

40 РЕАКЦИЙ

1 пробирка: 40 мкл фермента в буфере для хранения
1 пробирка : 0.5 мл 10x реакционного буфера

200 РЕАКЦИЙ

1 пробирка: 200 мкл фермента в буфере для хранения
1 пробирка : 1.5 мл 10x реакционного буфера

5. ХАРАКТЕРИСТИКИ

АКТИВНОСТЬ	**≥ 1000 ед./мкл**
ИНАКТИВАЦИЯ	**65°C (10 мин) или 70°C (5 мин)**

6. СОСТАВ РАСТВОРОВ

Буфер для хранения: 20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 50 мМ KCl, 1 мМ DTT, 0.1 мМ EDTA, 50% Глицерин
10× реакционный буфер: 400 мМ Tris-HCl (pH 7.8), 100 мМ MgCl, 100 мМ DTT, 5 мМ АТФ

7. КЛЮЧЕВЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За единицу активности принято количество фермента, необходимое для 50% лигирования 500 нг ДНК λ фага, расщепленной по HindIII, за 30 минут при 16°C.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Срок годности 2 года. Хранить при температуре -20°C.Для реакционного буфера избегать многократных циклов замораживания и размораживания. Рекомендуется сделать аликвоты реакционного буфера по 10 мкл для однократного использования.