

T4 DNA LIGASA

No.Catálogo: MBL223 (1000 U, 5U Weiss/ μ L)
MBL1001 (100 U, 1U Weiss/ μ L)

Versión: 05/2006

Fuente: Purificada a partir de una cepa de *E. coli* portadora de un plásmido hiperproductor del gen 30 del bacteriófago T4.

Condiciones de ensayo: 66mM Tris-HCl pH7.6 a 25°C, 6.6 mM MgCl₂, 0.066 mM ATP, 10 mM DTT, 3.3 μ M[α^{32} -PPi].

Definición de Unidad: Actualmente existen en el mercado dos sistemas para establecer la actividad de una ligasa. Uno de ellos emplea las unidades CEL (*cohesive end ligation*) y el otro las unidades Weiss. Una unidad Weiss de la enzima es aquella que cataliza la conversión de 1 nmol de α^{32} -P del pirofosfato en una forma adsorbente de Norit en 20 minutos a 37°C. La actividad de la enzima se ensaya en el buffer anteriormente descrito.

Una unidad Weiss es aproximadamente equivalente a 200 unidades CEL. Una unidad CEL se define como la cantidad de enzima requerida para ligar en un 50% los fragmentos *Hind*III de lambda en 30 minutos a 16°C.

Aplicaciones:

- La T4 DNA ligasa cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 5´ fosfato y uno 3´OH en una molécula de DNA o RNA de doble cadena, tanto si los extremos son romos como cohesivos.

1. En un microtubo prepare la siguiente mezcla de reacción:

50 ng	Vector Lineal (DNA)
x μ L	Inserto (Usar una relación molar 5:1 ó 3:1 inserto:vector)
1 μ L	10X Buffer T4 DNA Ligasa
1 μ L	T4 DNA Ligasa (5 U Weiss/ μ L)
hasta 10 μ L	H ₂ O

* La eficiencia de la ligación de los extremos romos aumenta añadiendo PEG 4000 (concentración final 5%)

2. Homogeneizar bien la mezcla de ligación

3. Incubar a 22°C 1 hora

4. Transformar con 2-5 μ L de la mezcla de ligación, tras inactivar la enzima a 65°C 10 minutos.

Comentarios

- *Si su ligación es de re-circularización del plásmido reduzca la cantidad de vector lineal a 25 ng*
- *Si el rendimiento de la ligación es insuficiente, prolongue el tiempo de ligación (toda la noche)*
- *Un exceso de mezcla de ligación con respecto a las células competentes reduce la eficiencia de la transformación*
- *Si la transformación es por electroporación es necesario eliminar la T4 DNA ligasa.*

- La enzima repara "nicks" de simple cadena en moléculas de doble cadena de DNA, RNA o híbridos DNA/RNA. La enzima no tiene actividad sobre ácidos nucleicos de simple cadena.

- Mutagénesis dirigida ya que une oligonucleótidos cortos con "mismatches".

- Unión de adaptadores o primers anillados:

1. En un microtubo prepare la siguiente mezcla de reacción:

50 ng	Vector Lineal (DNA)
5 µL	Adaptadores anillados (100 pmol/µL)
1 µL	10X Buffer T4 DNA Ligasa
1 µL	T4 DNA Ligasa (5 U Weiss/µL)
hasta 10 µL	H ₂ O

** La eficiencia de la ligación de los extremos romos aumenta añadiendo PEG 4000 (concentración final 5%)*

2. Homogeneizar bien la mezcla de ligación

3. Incubar a 22°C 1 hora

4. Transformar con 2-5 µL de la mezcla de ligación, tras inactivar la enzima a 65°C 10 minutos

Comentarios

- *Si en la estrategia de clonación no es necesario defosforilar el vector, los adaptadores pueden ser sintetizados sin fosforilar*

Tampón de reacción: 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH7,8

Inhibidores de la T4 DNA ligasa: La enzima es fuertemente inhibida por NaCl o KCl en concentraciones superiores a 200 mM

Controles de calidad: Carente de endonucleasas, exonucleasas y fosfatasas. Funcionalmente testada por la capacidad de unión de fragmentos romos y cohesivos.

Envío y almacenamiento del producto: El almacenamiento de rutina a -20°C es altamente recomendado.