

Т4 ДНК лигаза

Рекомбинантный фермент выделен из штамма *E.coli*, несущего клонированный ген лигазы бактериофага Т4. Фермент катализирует образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатной и 3'-гидроксильными концевыми группами двуцепочечной ДНК. Фермент использует АТФ в присутствии Mg^{2+} в качестве кофактора.

Область применения

- лигирование линкерных адаптеров
 - сшивка одноцепочечного разрыва ДНК
 - циклизация линейной ДНК
- Т4 ДНК лигаза не предназначена для клонирования ПЦР-продуктов в рAL2-Т вектор. Для этого приложения рекомендуется использовать Quick-TA ДНК лигазу, входящую в набор для клонирования Quick-TA kit (Кат #ТАК02, Евроген)

Кат.#	Концентр. фермента	Кол-во ед.	Состав
LK001	100 ед./мл	10 000 ед	Т4 ДНК лигаза, 100 мкл 10X Overnight ligation буфер, 250 мкл 5X Quick ligation буфер, 250 мкл

Одна единица активности фермента лигирует 50% сшивки *HindIII*-фрагментов ДНК фага λ за 30 мин при 16°C в 20 мкл реакционной смеси.

Хранение и транспортировка: –20°C.

Срок хранения: при соблюдении условий хранения и транспортировки – 1 год со дня поставки.

Реакционные буферы

Т4 ДНК лигаза комплектуется двумя буферами:

5X Quick ligation буфер предназначен для быстрого лигирования (5-15 минут при комнатной температуре).

10X Overnight ligation буфер применяется для стандартного лигирования (14-16 часов при 14°C).

Для клонирования сложных смесей или фрагментов с низкой концентрацией рекомендуется использовать стандартный протокол.

В состав обоих буферов входят АТФ и ДТТ, которые плохо сохраняются в водных растворах, поэтому буфер не следует оставлять при комнатной температуре после окончания работы. Чтобы минимизировать число циклов заморозки-разморозки, рекомендуется хранить буферы небольшими аликвотами и размораживать по мере необходимости.

Перед использованием реакционный буфер необходимо тщательно перемешать.

Инактивация фермента:

Температурная инактивация фермента наступает после десятиминутной инкубации при 65°C или 5 - минутной инкубации при 70°C.

- ▶ для большинства приложений инактивация фермента не требуется. Фермент ингибируется NaCl и KCl в концентрации 200 мМ, а также ЭДТА в концентрации 20 мМ.
- ▶ Ингибирование реакции лигирования путем добавления химических веществ приводит к необходимости очистки лигата для дальнейших ферментативных обработок или трансформации.

Протокол

- ▶ При работе следует избегать нагревания фермента до комнатной температуры. Используйте контейнер-холодильник или тару со льдом.

Протокол лигирования ДНК-вставки в плазмиду (вектор)

1. Произведите очистку ДНК-вставки и линейаризованного вектора после обработки рестриктазами.

Рекомендуется провести препаративную очистку вектора через 0.8-1% агарозный гель для удаления от продуктов неполной рестрикции.

- ▶ Очистка вектора на геле позволяет существенно снизить количество колоний, лишенных вставки.

Для очистки можно воспользоваться одним из наборов для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (Кат## BC022, BC023, Евроген).

2. Оцените концентрацию вектора и вставки

- ▶ Измерение концентрации можно провести любым спектрофотометрическим методами (например, Nanodrop или УФ спектрофотометр). Можно быстро оценить концентрацию ДНК с помощью аналитического электрофореза в агарозе с бромистым этидием (для сравнения используется маркер длин ДНК с заданной концентрацией).

3. В чистой пробирке приготовьте реакционную смесь, смешивая реагенты в порядке, указанном ниже.

- ▶ **Внимание! При работе с несколькими образцами одновременно не готовьте общую смесь (премикс), содержащую один из фрагментов ДНК и лигазу! Добавляете фермент в готовую реакционную смесь в последнюю очередь**
- ▶ Перед использованием тщательно перемешайте буфер.

Компонент	Быстрое лигирование (5-15 минут при комнатной температуре), объем	Стандартное лигирование (14-16 часов при 14 °С), объем
Стерильная вода	до 10 мкл	до 10 мкл
5x Quick ligation буфер	2 мкл	–
10x Overnight ligation буфер	–	1 мкл
Линейаризованный вектор	переменный* 10-100 нг	переменный* 10-100 нг
Вставка (3-10-кратный молярный избыток вставки по отношению к вектору)**	переменный**	переменный**
T4 ДНК лигаза	1 мкл	1 мкл

* Оптимальное соотношение однородной вставки и вектора 3:1(в молярном отношении)

** В случае клонирования библиотек кДНК избыток вставки увеличивают до 8-10 кратного (в молярном отношении).

Для расчета количества вставки для лигирования в вектор воспользуйтесь следующей формулой:

$$X \text{ (нг)}_{\text{вставки}} = \frac{3 \div 10_{\text{избыток вставки}} \times \text{длина вставки (п.о.)} \times \text{количество вектора (нг)}}{\text{длина вектора (п.о.)}}$$

4. Перемешайте компоненты реакции без образования пены, сбросьте капли со стенок пробирки путем импульсного откручивания.
5. Инкубируйте реакцию в течении времени, рекомендованного для используемого буфера.
6. После окончания реакции пробирку с реакционной смесью следует сразу заморозить.
 - ▶ Инактивацию нагреванием не рекомендуется проводить, в случае дальнейшей трансформации это приводит к снижению количества трансформантов.

Трансформация *E.coli*

Для трансформации *E.coli* лигазной смесью подходит любой стандартный протокол. Число колоний, выросших на чашке, зависит от эффективности трансформации выбранного штамма компетентных клеток. Для успешного клонирования эффективность трансформации компетентных клеток не должна быть меньше 1×10^7 cfu/ μg .

- В случае применения химически компетентных клеток (кальциевый метод) добавьте 5 мкл неочищенного лигата к 50-100 мкл клеточной суспензии. Можно использовать компетентные клетки для химической трансформации (Кат# СС001, Евроген).
 - ▶ Для эффективной трансформации объём реакционной смеси не должен превышать 10% от объёма компетентных клеток.
 - ▶ Не рекомендуется превышать количество лигазы, заявленное в протоколе лигирования.
- В случае использования процедуры электропорации, лигат необходимо почистить от реакционной смеси и растворить в деионизованной воде (очистка методом переосаждения или на колонке). Затем добавьте 5-10 мкл раствора, полученного после очистки лигата, к 50-100 мкл электрокомпетентных клеток. Далее следуйте стандартным протоколам и рекомендациям производителей приборов для электропорации.

Протокол лигирования линкерных адаптеров (линкеров)

1. Подготовьте линейаризованную ДНК после обработки рестриктазами и олигонуклеотидные адаптеры.

Линейаризованная ДНК должна быть очищена от реакционной смеси.
Для очистки можно воспользоваться одним из наборов для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (Кат ## ВС022, ВС023, Евроген).

 - ▶ Необходимо помнить, один из компонентов, предпочтительно линейаризованная ДНК, должна иметь 5'-фосфорилированные концы (в процессе обработки ДНК рестриктазой на 5'-конце остаётся фосфат).
 - ▶ Адаптеры – это химически синтезированные одноцепочечные ДНК-фрагменты (олигонуклеотиды), частично или полностью комплементарные друг другу для формирования дуплексов ДНК, которые является субстратом для лигазы. Адаптеры могут содержать сайт рестрикции или последовательность для отжига праймера.
 - ▶ При стандартном синтезе олигонуклеотиды не имеют фосфата на 5'-конце. Для получения фосфата на 5'-конце синтезированного олигонуклеотида необходимо провести реакцию фосфорилирования полинуклеотидкиназой (PNK). Этот фермент катализирует перенос фосфата молекулы АТФ на 5'-конец ДНК (адаптора). Также можно заказать синтез модифицированного олигонуклеотида с 5'-фосфатом.

2. Оцените концентрацию линейризованной ДНК

► Измерение концентрации можно провести любым спектрофотометрическим методами (например, Nanodrop или УФ спектрофотометр). Можно быстро оценить концентрацию ДНК с помощью аналитического электрофореза в агарозе с бромистым этидием (для сравнения используется маркер длин ДНК с заданной концентрацией).

3. В чистой пробирке приготовьте реакционную смесь, смешивая реагенты в порядке, указанном ниже.

► Перед использованием тщательно перемешайте буфер.

► **Внимание! При работе с несколькими образцами одновременно не готовьте общую смесь (премикс), содержащую один из фрагментов ДНК и лигазу! Добавляете фермент в готовую реакционную смесь в последнюю очередь**

Компонент	Быстрое лигирование (5-15 минут при комнатной температуре), объем	Стандартное лигирование (14-16 часов при 14 °С), объем
Стерильная, свободная от нуклеаз, вода	до 10 мкл	до 10 мкл
5x Quick ligation буфер	2 мкл	–
10x Overnight ligation буфер	–	1 мкл
Линейризованная ДНК	переменный* 10-500 нг	переменный* 10-500 нг
Смесь адаптерных последовательностей* в равной концентрации	переменный*	переменный*
T4 ДНК лигаза	1 мкл	1 мкл

* Оптимальное соотношение линейризованной ДНК и смеси адаптеров в реакции лигирования 1:10 – 1:50 (в молярном отношении).

4. Перемешайте компоненты реакции без образования пены, сбросьте капли со стенок пробирки путем импульсного откручивания.

5. Инкубируйте реакцию в течении времени, рекомендованного для используемого буфера.

6. После окончания реакции пробирку с реакционной смесью следует сразу заморозить.

► Инактивация фермента для большинства приложений не требуется.

Анализ реакции лигирования на агарозном геле

Если планируется анализировать продукты реакции лигирования на агарозном геле, следует учесть, что комплекс лигазы с ДНК, образующийся в реакционной смеси, может привести к смещению полос в процессе электрофореза. Для предотвращения получения некорректных результатов следует добавить в буфер для нанесения образцов на гель EDTA (до 10 мМ) и SDS (до 1 %) для разрушения комплексов ДНК с ферментом или очистить продукты лигирования от реакционной смеси.

Очистка продуктов лигирования от избытка адаптеров

Для некоторых приложений необходимо провести очистку лигата от избытка адаптеров и образовавшихся димеров, которые всегда формируются в процессе лигирования. Очистку проводят через гель с последующей очисткой на колонках. Наилучшие результаты достигаются при очистке с помощью реагента Agencourt® AMPure®, особенно при работе с малым количеством ДНК.