

Т4 ДНК лигаза

Версия 02 от 21 марта 2019 г.

Рекомбинантный фермент выделен из штамма *E. coli*, несущего клонированный ген лигазы бактериофага Т4. Фермент катализирует образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной концевыми группами двухцепочечной 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 pAL2-T вектор. Для этого приложения рекомендуется использовать Quick-TA ДНК лигазу, входящую в набор для клонирования Quick-TA kit (кат. # TAK02, Евроген).

Кат. #	Конц. фермента	Количество	Состав
LK001	100 ед./мкл	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 °С в 20 мкл реакционной смеси.

Хранение и транспортировка: –20 °С.

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 °С).

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.

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

Инактивация фермента

Температурная инактивация фермента наступает после десятиминутной инкубации при 65 °С или пятиминутной инкубации при 70 °С.

- 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 дальнейшей ферментативной обработки 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 продуктов неполной рестрикции.

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

Для этого можно воспользоваться набором для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (например, [кат. ## BC022](#), [BC041 S/L](#), [BC023](#), Евроген).

2. Оцените концентрацию вектора и вставки.

- ▶ Измерение концентрации можно провести любым спектрофотометрическим методом (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 (например, [кат. ## NL001](#), [NL002](#), [NL003](#), Евроген).

3. В чистой пробирке приготовьте реакционную смесь, смешивая реагенты в порядке, указанном ниже. Буфер перед использованием тщательно перемешайте. Общий объем готовой смеси – 10 мкл.

ВНИМАНИЕ!

При работе с несколькими образцами одновременно не готовьте общую смесь (премикс), содержащую один из фрагментов ДНК и лигазу!

Добавляйте фермент в готовую реакционную смесь в последнюю очередь.

Компонент	Быстрое лигирование (5–15 минут при комнатной температуре), количество	Стандартное лигирование (14–16 часов при 14 °С), количество
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
Стерильная вода	до 9 мкл	до 9 мкл
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.

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 центрифугированием.
5. Инкубируйте реакционную смесь в течение 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. Например, можно использовать компетентные клетки [кат. ## CC001, CC002, CC003](#), Евроген.
 - ▶ Для эффективной трансформации объем реакционной смеси не должен превышать 10% от объема компетентных клеток.
 - ▶ Не рекомендуется превышать количество лигазы, заявленное в протоколе лигирования.
- В случае использования процедуры электропорации, лигат необходимо очистить 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** (например, [кат. # CC004 S/M](#), Евроген). 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 этого можно воспользоваться набором для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (например, [кат. ## BC022, BC041 S/L, BC023](#), Евроген).
 - ▶ Один из компонентов, предпочтительно линейаризованная ДНК, должен иметь 5'-фосфорилированные концы (в процессе обработки ДНК рестриктазой на 5'-конце остается фосфат).
 - ▶ Адаптеры – это химически синтезированные одноцепочечные ДНК-фрагменты (олигонуклеотиды), частично или полностью комплементарные друг другу для формирования дуплексов ДНК, которые являются 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 (ПНК). Этот фермент катализирует перенос фосфата молекулы АТФ на 5'-конец ДНК (адаптера). Также можно заказать синтез модифицированного олигонуклеотида с 5'-фосфатом.

2. Оцените концентрацию линейризованной ДНК.

► Измерение концентрации можно провести любым спектрофотометрическим методом (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 (например, кат. ## NL001, NL002, NL003, Евроген).

3. В чистой пробирке приготовьте реакционную смесь, смешивая реагенты в порядке, указанном ниже. Буфер перед использованием тщательно перемешайте. Общий объем готовой смеси – 10 мкл.

ВНИМАНИЕ!

При работе с несколькими образцами одновременно не готовьте общую смесь (премикс), содержащую один из фрагментов ДНК и лигазу!

Добавляйте фермент в готовую реакционную смесь в последнюю очередь.

Компонент	Быстрое лигирование (5-15 минут при комнатной температуре), количество	Стандартное лигирование (14-16 часов при 14 °С), количество
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
Стерильная вода, свободная от нуклеаз	до 9 мкл	до 9 мкл
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 центрифугированием.

5. Инкубируйте реакционную смесь в течение 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 адаптеров. Очистку рекомендуется проводить на магнитных частицах (например, CleanMag DNA, кат. # BC35 T/S/M/L, Евроген).