



Инструкция по применению

Genta-T4 ДНК-лигаза

Т4 ДНК-лигаза

Версия 1 от 23.01.2023

1. ОПИСАНИЕ

Genta-T4 ДНК-лигаза представляет собой рекомбинантный фермент, который катализирует образование фосфодиэфирной связи между 5'-фосфатной и 3'-гидроксильными концевыми группами двуцепочечной ДНК.

Выделена из штамма *Escherichia coli*, экспрессирующего ген ДНК-лигазы бактериофага Т4.

ДНК-лигаза сшивает как липкие, так и тупые концы, может восстанавливать одонитевые разрывы в двойных цепях ДНК, РНК или гибридов ДНК/РНК.

2. СОСТАВ

Компоненты	RP-E-018-S	RP-E-018-L	RP-E-018-X (под заказ)
Genta-T4 ДНК-лигаза, 400 000 ед./мл	0,05 мл	0,25 мл	XXX мл
10x буфер	0,5 мл	2 x 1,25 мл	XXX мл

3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

- Лигирование двуцепочечных ДНК с тупыми или липкими концами
- Репарация одноцепочечных разрывов в двуцепочечных молекулах ДНК/РНК
- Сайт-направленный мутагенез
- Лигирование олигонуклеотидных линкеров или адаптеров
- Циклизация линейной ДНК

4. БУФЕР ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ РЕАКЦИИ (1X)

50 мМ Трис-НСl (рН 7,5 при 25°C); 10 мМ ДТТ; 10 мМ MgCl₂; 1 мМ АТФ.

5. БУФЕР ДЛЯ ХРАНЕНИЯ

25 мМ HEPES-НСl (рН 7,9 при 25°C); 100 мМ KCl; 1 мМ ДТТ; 0.1 мМ ЭДТА; 50% глицерин.



6. ПРОТОКОЛ РАБОТЫ

1. Рекомендуемый объем реакционной смеси 10-20 мкл.
2. Состав реакционной смеси

Компонент	Количество
Линеаризованная векторная ДНК	10 – 100 нг
ДНК-вставка	В молярном соотношении от 1:1 до 5:1 к векторной ДНК
10x буфер для T4 ДНК-лигазы	1 мкл
Genta-T4 ДНК-лигаза, 400 000 ед./мл	0,25 – 0,5 мкл (100 - 200 ед.)
Вода (свободная от нуклеаз)	До 10 мкл

3. Проведение реакции: 2 часа при температуре 25°C или в течение ночи при температуре 16°C.
4. Остановить реакцию прогревом 10 минут при 65°C или 5 мин при 70°C.
5. Соотношение количества векторной ДНК и ДНК-вставки подбирается экспериментально. В случае клонирования библиотек кДНК избыток вставки необходимо увеличить до 8–10–кратного. Для достижения оптимальных результатов (особенно в случае вставки с «тупыми концами») (blunt-end ligation) рекомендуется проведение лигирования в течение ночи при температуре 16°C.

7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ И ХРАНЕНИЯ

Температура хранения: - 20°C.

Условия транспортировки: в термоконтейнере с хладоэлементами, при температуре от 2°C до 8°C не более 7 суток.

Срок хранения при соблюдении условий хранения и транспортировки: 24 месяца с момента производства.



СЕРТИФИКАТ КАЧЕСТВА

✓ **Неспецифическая эндонуклеазная активность**

Инкубация 2000 ед. фермента с 1 мкг ДНК pUC19 при 37°C в течение 4 часов не приводит к видимому изменению электрофоретической подвижности ДНК (по результатам агарозного гель-электрофореза).

✓ **Неспецифическая экзодезоксирибонуклеазная активность**

Инкубация 2000 ед. фермента с 1 мкг лямбда ДНК/Hind III при 37°C в течение 16 часов не приводит к видимой деградации фрагментов ДНК (по результатам агарозного гель-электрофореза).

✓ **ДНКазная активность по отношению к одноцепочечному олигонуклеотиду**

Инкубация 2000 ед. фермента с флуоресцентно меченным одноцепочечным олигонуклеотидом при 37°C в течение 1 часа не приводит к разгоранию флуоресценции.

✓ **ДНКазная активность по отношению к двуцепочечному олигонуклеотиду с тупыми концами**

Инкубация 2000 ед. фермента с флуоресцентно меченным двуцепочечным олигонуклеотидом с тупыми концами при 37°C в течение 1 часа не приводит к разгоранию флуоресценции.

✓ **ДНКазная активность по отношению к двуцепочечному олигонуклеотиду с 5'-выступающими концами**

Инкубация 2000 ед. фермента с флуоресцентно меченным двуцепочечным олигонуклеотидом с 5'-выступающими концами при 37°C в течение 1 часа не приводит к разгоранию флуоресценции.

✓ **ДНКазная активность по отношению к двуцепочечному олигонуклеотиду с 3'-выступающими концами**

Инкубация 2000 ед. фермента с флуоресцентно меченным двуцепочечным олигонуклеотидом с 3'-выступающими концами при 37°C в течение 1 часа не приводит к разгоранию флуоресценции.

✓ **РНКазная активность**

Инкубация 2000 ед. фермента с флуоресцентным РНК-субстратом при 37°C в течение 1 часа не приводит к разгоранию флуоресценции.



Инструкция Genta-T4 ДНК-лигаза

Версия 1
от 23.01.2023
Стр 4

✓ Чистота белка (SDS-ПААГ)

Genta-T4 ДНК-лигаза имеет чистоту $\geq 99\%$, определено путём окрашивания SDS-ПААГ раствором Кумасси.

✓ Контаминация геномной ДНК *E.coli* (ПЦР-РВ)

2000 ед. Genta-T4 ДНК-лигазы были проверены на наличие геномной ДНК *E.coli* с использованием TaqMan ПЦР-РВ с праймерами, специфичными для локуса 16S рРНК *E.coli*. Контаминация не выявлена.

✓ Функциональное тестирование

1. Инкубация 1 ед. Genta-T4 ДНК-лигазы с 6 мкг лямбда ДНК/Hind III при 16°C в течение 15 мин, 30 мин, 1 часа, 2 часов с последующей детекцией продуктов реакции лигирования методом агарозного гель-электрофореза для определения процента лигированной ДНК.
2. Инкубация Genta-T4 ДНК-лигазы с молекулярным биконом и двумя олигонуклеотидами, комплементарными последовательностям петли молекулярного бикона, при 37°C в течение 30 мин. Первоначальная гибридизация каждого олигонуклеотида с половиной области петли молекулярного бикона незначительно дестабилизирует структуру стебля, в то время как последующая реакция лигирования двух олигонуклеотидов приводит к полной денатурации молекулярного бикона и разгоранию флуоресценции. Удельная активность фермента определяется по скорости увеличения интенсивности флуоресценции.

Уважаемый Пользователь!

Благодарим Вас за выбор продукта от АО «ГенТерра»!

Если у Вас есть рекомендации по улучшению данного продукта или пожелания по расширению нашей линейки продукции, мы будем Вам признательны если вы предоставите на обратную связь по адресу info@genterra.ru

