

T4 DNA Ligase

T4 DNA Ligase (T4 Bakteriophage aus *Escherichia coli*)

Artikel Nr.	Größe
E1060-01	20 000 CE Einheiten (~300 Weiss Einheiten)
E1060-02	100 000 CE Einheiten (~1500 Weiss Einheiten)

Definition der Einheit:

Eine Einheit wird als die Menge des Enzyms definiert, das erforderlich ist, um 50 % der Hind III Fragmente aus Lambda-Phagen-DNA zu ligieren. Die Inkubation wird bei 16°C durchgeführt in Reaktionsansätzen mit einem Volumen von 20 µl mit einer Konzentration freier DNA-Enden von 0,02 µM (50 µg/ml).

Bemerkung:

67 Ligationseinheiten (Ligationseinheit, bezogen auf kohäsive Enden) entsprechen einer Weiss-Einheit.

Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°C

Empfohlene Reaktionsbedingungen:

Obwohl der Einsatz geringerer Enzymmengen und deutlich kürzere Reaktionszeiten möglich sind, empfehlen wir wegen der Kinetik der Ligationsreaktion folgende Bedingungen: Ligation über Nacht bei 16°C mit 0.3-1 µl des Enzyms in einem Ansatz mit einem Reaktionsvolumen von 10 - 20 µl. Die Effizienz der anschließenden Transformation kann durch Phenol-Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung gesteigert werden.

Hocheffiziente T4 DNA Ligase, verknüpft mehr als 95% geschnittener DNA-Fragmente in weniger als einer Stunde.

Beschreibung:

- T4 DNA Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen in doppelsträngiger DNA oder RNA.
- Katalysiert die kovalente Verbindung von Duplex-DNA-Molekülen an stumpfen Enden (blunt ends) (1).
- Katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen Duplex-DNA-Bruchstücken mit komplementären kohäsiven Enden.
- Schließt einzelsträngige Einschnitte (Kerben, nicks) in Duplex-DNA, -RNA oder DNA-RNA Hybriden
- Ultrareines rekombinantes Enzym.
- Geeignet für die Ligierung von Restriktionsfragmenten und um Verbindungsstücke (linkers) oder Adapter an DNA mit stumpfen Enden (blunt ends) anzufügen.

1 x Reaktionspuffer (Reaction buffer):

50 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 25°C), 10 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

10 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 22°C), 1 mM Dithiothreitol, 50 mM KCl und 50 % (v/v) Glycerin.

Assay Conditions:

66 mM Tris (pH 7.6 bei 22°C), 6.7 mM MgCl₂, 67 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol, 3.3 µM [α-³²P]Na₄P₂O₇. Das Reaktionsvolumen ist 300 µl.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, Exonuklease-, unspezifische RNase sowie einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft. Typische Präparationen sind zu mehr als 95% rein, wie aufgrund SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese beurteilt werden kann

Literatur:

1. Weiss, B., Jacquemin-Sablan, A., Live, T.R., Fareed, G.C. und Richardson, C.C. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 4543-4555.
2. Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory Manual, second edition, pp. 1.53-1.73, Cold Spring Harbor, New York.*
3. Dugaiczky A. et al. (1975) *J mol Biol* 96: 171-184
4. Damak S., Bullock D.W. (1993) *Biotechniques* 15:448-452
5. Cranenburgh R.M. (2004) *Appl Microbiol Biotechnol.* 65: 200-202

T4 DNA Ligase LIGATION - PROTOKOLL

Vorbereitung der Ligation:

Protokoll für die Ligation kohäsiver und stumpfer Enden (2)

- Plasmid- und Einsatz-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen schneiden.
- DNA reinigen durch Phenol-/Chloroform-Extraktion oder Zentrifugationssäulchen (z.B. EURx PCR/DNA Clean Up Kit, Best.Nr. E3520).
- 20-100 ng Vektor-DNA und im 1-3fachen molaren Verhältnis Einsatz-DNA in ein Plastikreaktionsgefäß überführen (siehe Formel unten). Gesamtvolumen 8 bis 8.8 µl (abhängig von der Menge an T4 DNA Ligase)
- Für 5 min auf 45°C erhitzen, um ggf. noch anlagernde kohäsive DNA-Enden zu schmelzen.
- Kurz auf Eis abkühlen.
- Auf 10 µl Volumen: 10x T4 DNA Ligase Puffer 1 µl
- T4 DNA Ligase 50 bis 400 U
- Für 1 - 4 h (min. 10 min) inkubieren: Bei 16°C oder 25°C (RT) (für kohäsive Enden) oder für 1 - 16 h bei 16°C (für stumpfe Enden).
- Je 1-2 µl pro Ligationsreaktion in die Transformation einsetzen.

Hinweis: T4 DNA Ligase Puffer enthält ATP.

Hinweis: Die Stumpfendligation ist weniger effizient als die Kohäsivendligation. Die folgenden Voraussetzungen sollten für Stumpfendligationen erfüllt werden (2):

- Niedrige ATP-Konzentrationen (<0.5 mM).
- Vollständige Abwesenheit von Polyaminen (z.B. Spermidin).
- Hohe Ligasekonzentrationen.
- Hohe Substratkonzentrationen (stumpfe Enden).

Hinweis: Auch andere Reaktionspuffer können als Reaktionspuffer zur Ligation verwendet werden, sofern sie 1 mM ATP enthalten. Beispiele: Restriktionspuffer Acet, Low, Medium und High; T4 Polynukleotidkinase Puffer oder andere Niedrigsalzpuffer. Hohe Salzkonzentrationen (>200 mM) inhibieren die T4 DNA Ligase sehr stark.

Hocheffizientes, zweistufiges Protokoll zur Ligation stumpfer (blunt) Enden (4)

Dieses materialintensive Protokoll sollte nur verwendet werden, wenn sehr hohe Ligationseffizienzen benötigt werden, z.B. bei der Klonierung von Genbibliotheken. Wirkprinzip: Der erste Schritt der Ligation, intermolekulare Ligationsereignisse (Enden von Vektor- zu Einsatz-DNA), findet bevorzugt bei hohen DNA Konzentrationen statt. Der zweite Reaktionsschritt, das Zusammenfügen beider Enden innerhalb eines DNA-Moleküls zur Zirkularisierung, wird bei niedrigen DNA-Konzentrationen begünstigt.

- Plasmid- und Einsatz-DNA mit geeigneten Restriktasen verdauen.
- Vektor- und Einsatz-DNA in hohen Konzentrationen bereitstellen (>50 ng µl⁻¹).
- 0.1 µg Vektor DNA und die äquimolare Menge an Einsatz-DNA in einem Volumen von 10 µl mischen.
Hinweis: Unter diesen Bedingungen wird die Ligation von Vektor- zu Einsatz-DNA begünstigt.
- Für 1 h bei Raumtemperatur inkubieren.
- Reaktion 20 fach mit 1x T4 Ligase buffer und T4 DNA Ligase verdünnen.
Hinweis: Unter diesen Bedingungen wird die Selbst-Ligation begünstigt und die DNA-Moleküle werden zirkularisiert.
- Über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren.

Elektroporation

1-2 µl (max. 5 µl) zur Transformation von 50 µl Elektro- or chemisch kompetenten Zellen einsetzen. Die Effizienz der Transformation wird erhöht durch: Lange Ligationszeiten (1 h oder länger), durch Hitzeinaktivierung (10 min, 65°C; nicht anwendbar mit PEG) oder durch DNA-Ethanol-fällung.

Formel zur Berechnung optimaler Vektor- und Einsatz (Insert)-DNA Volumina (5)

Die Effizienz der Ligation hängt entscheidend von hohen DNA-Konzentrationen ab. Deswegen sollte der Reaktionsansatz möglichst nicht mit H₂O verdünnt werden. Cranenburgh (2004) gibt folgende Formel zur schnellen Berechnung optimaler Vektor- und Einsatz-DNA Konzentrationen an:

$$(1) \quad V_v = \frac{T}{\left(\frac{V_e \cdot I_i \cdot R}{I_e \cdot V_i}\right) + 1}$$

$$(2) \quad I_v = T - V_v$$

Beispiel:

Abk.	Beschreibung	Beispiel-Wert	Abk.	Beschreibung	Beispiel-Wert
I _i	Einsatz (Insert)-Länge	1.8 kb	V _i	Vektor-Länge	3.2 kb
I _e	Konzentration Einsatz-DNA	20 ng µl ⁻¹	V _e	Vektor-Konzentration	50 ng µl ⁻¹
R	Einsatz-/Vektor-DNA Verhältnis	2	T	Gesamt-DNA Volumen	8 µl
V _e	Volumen Einsatz-DNA	Zu berechnen	V _v	Volumen Vektor-DNA	Zu berechnen

$$(1) \quad V_v = \frac{8 \mu\text{l}}{\left(\frac{(50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1} \cdot 1.8 \text{ kb} \cdot 2)}{(20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1} \cdot 3.2 \text{ kb})}\right) + 1} = \frac{8 \mu\text{l}}{\left(\frac{180}{64}\right) + 1} = 2,10 \mu\text{l}$$

$$(2) \quad I_v = 8 \mu\text{l} - 2,10 \mu\text{l} = 5,9 \mu\text{l}$$

Hinweise:

1. Voraussetzungen für effiziente Ligation:

- Saubere, gut gereinigte Lösungen linearisierter Vektor und Einsatz-DNAs.
- Hohe Konzentrationen linearisierter Vektor und Einsatz-DNAs (empfohlen 5 - 50 ng/µl) führen zur Bevorzugung zwischenmolekularer Ligation gegenüber Selbst-Ligation. Extrem hohe DNA Konzentrationen führen zur unerwünschter Ausbildung sehr langer DNA-Multimere.
- Vektor- und Einsatz-DNA in molaren Anteilen zwischen 1:1 und 1:3 (empfohlen: 1:2). Bei Vektor/Einsatz-DNA Verhältnissen von 1:1 werden intermolekulare Ligationen bevorzugt. Bei Relationen von 1:3 und mehr bilden sich Multimere von DNA-Molekülen.

2. **Reaktionsgeschwindigkeit:** Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt ausschliesslich von der Konzentration freier, kompatibler DNA-Enden ab, unabhängig davon, ob sich die Enden auf dem selben DNA-Strang befinden (intermolekulare Ligation) oder auf unterschiedlichen DNA-Strängen (intermolekulare Ligation). Intermolekulare Ligation wird tendenziell gegenüber Selbstligation bevorzugt, wenn DNA Konzentrationen hoch und DNA-Stränge lang sind. Dagegen führen niedrige DNA Konzentrationen und kurze DNA-Längen zur Begünstigung von Selbstligation. Unter letztgenannten Bedingungen ist es wahrscheinlicher, dass zwei kompatible Enden desselben DNA Stranges in engen räumlichen Kontakt treten, als die Enden verschiedener DNA-Moleküle. Für eine ausführliche Diskussion siehe (2, 3, 4).

3. **Dephosphorylierte DNA:** Eine optionale Strategie zur Vermeidung von Selbstligation ist es, 5'-Phosphate von Plasmid-DNA (aber nicht von Insert-DNA) zu entfernen. Bakterielle und Kalbs-Intestinum Phosphatase (Best. Nr. E1026 and E1025) katalysieren den Abbau von 5'-Phosphatgruppen aus DNA und RNA (2). Dephosphorylierung von Plasmid-DNA verhindert effizient die Selbstligation, allerdings um den Preis, dass nur zwei neue Phosphodiesterbrücken während der Ligation gebildet werden können (nicht vier, wie bei phosphorylierter DNA). Darum besitzen ligierte Moleküle zunächst zwei Kerben, die allerdings nach erfolgter Transformation durch die Wirtszelle repariert werden.

4. **Konzentrierende Substanzen:** Substanzen, die makromolekulare Verdichtungseffekte erzeugen (z.B. Polyethylenglykol oder HexaminKobalt Chlorid) können eingesetzt werden, um niedrige DNA-Konzentrationen auf adäquate Werte für Stumpfendligationen anzuheben (2). Übliche Polyethylenglykol (PEG8000)-Endkonzentrationen liegen zwischen 5 % und 15 %. Ein Überschuss an Verdichtungssubstanzen führt zu übermäßig hohen DNA-Konzentrationen und damit zur Ausbildung sehr langer, linearer DNA-Multimere, die eine Transformation inhibieren können.

5. Optionale Kontrollreaktionen:

- Geschnittener Vektor, keine Einsatz-DNA: Zur Abschätzung des Hintergrundes durch Selbst-Ligation. Stumpfe Enden: Zusätzliche Überprüfung genereller Ligierbarkeit.
- Geschnittener Vektor, keine Ligase: - Zur Abschätzung des Hintergrundes durch unverdaute Vektor-DNA.
- Ungeschnittener Vektor - Zur Abschätzung der Transformationseffizienz.