



PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

Innovación y Desarrollo en Biotecnología

T4 ADN Ligasa (3U/μl)

Cat. no. EC10

Almacenamiento: -20°C

Fuente: *E. coli* recombinante

Presentaciones

Product Components	Size	Concentration
T4 ADN Ligasa	60 U	3 U (weiss)/μl
10x T4 ADN Ligasa Buffer	30 μl	-

PRODUCTOS BIO-LOGICOS

<http://www.pb-l.com.ar>

Introducción

La T4 ADN Ligasa cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un grupo 5'-fosforilo y un grupo 3'-hidroxilo adyacente de un dúplex de ADN o ARN o ADN/ARN en una configuración de extremos romos o cohesivos. Se requiere ATP para la reacción.

Definición de Unidad

Una unidad weiss es la cantidad de enzima requerida para catalizar la incorporación de un nanomol de ³²P (a partir de ³²P_i) en ATP, medido como material adsorbible en Norit, en 20 min a 37°C.

Una unidad de extremos cohesivos es definida como la cantidad de enzima requerida para ligar el 50% de los fragmentos HindIII del ADN del fago lambda (concentración de extremos 5' del ADN 0,12 μM -300 μg/ml-) an 20 μl de Buffer 1x T4 ADN Ligasa en 30 min. a 16°C. Una unidad Weiss es equivalente a aproximadamente 200 unidades de extremos cohesivos.

Buffer de almacenamiento

20 mM Tris-HCl (pH7,5); 50 M KCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 50 % (v/v) glicerol.

10×T4 ADN Ligasa Buffer

10×T4 ADN ligasa Buffer: 400 mM Tris-HCl (pH7,8); 100mM MgCl₂; 100 mM DTT; 5 mM ATP.

Ejemplo

- Colocar el T4 ADN Ligasa Buffer en hielo para que se descongele lentamente, luego centrifugar brevemente.
- Para una reacción de 10 μl, armar la siguiente reacción en un tubo de microcentrífuga colocado en hielo.

Componente	reacción de 10μl
10x T4 ADN Ligasa Buffer	1 μl
ADN Vector	aprox. 0.01 pmol
Inserto de ADN	aprox. 0.01 pmol
T4 ADN Ligasa	0,5-1 μl
Agua libre de nucleasas	c.s.p. 10 μl

- Incubar a 16°C toda la noche.
- Enfriar en hielo y transformar 3-5 μl de la reacción cada 100 μl de células competentes.

Notas Importantes

- Relación molar inserto/vector: para diferentes vectores y fragmentos de ADN, se deben probar ligaciones con diferentes relaciones molares. En muchos casos, la relación molar recomendable inserto/vector es 3-10/1.
- El ATP está incluido en el 10x T4 ADN Ligasa Buffer. Para evitar la degradación del ATP, es recomendable que el 10x T4 ADN Ligasa Buffer sea distribuido en pequeñas alícuotas y almacenado a -20°C.
- Para la ligación a vectores con extremos romos, el plásmido debería ser defosforilado para prevenir la recircularización.

Atención: el PEG puede ayudar en la ligación de extremos romos, pero debe ser usado cuidadosamente, ya que también podría llevar a la concatenación de los fragmentos a clonar y dificultar la transformación.

El producto es desarrollado únicamente para investigación, no para diagnóstico, o tratamiento de enfermedades, ni para comida, o cosméticos.