

## T4 DNA Ligase

Cat. No.	용량	농도
DYO1260	20,000 units	400 units/μl
DYO1262	40,000 units	400 units/μl
DYO1264	100,000 units	400 units/μl
DYO1266	100,000 units	2000 units/μl

### ◆ 제품구성

T4 DNA Ligase
10X T4 DNA Ligase buffer
Sterile water

### ◆ 보관온도

- 20°C

### ◆ 품질관리

- 순도: >99% on SDS-PAGE · Endonuclease-free
- Exonuclease-free · Phosphatase-free

### ◆ 제품특징

- 분자량: 55 kDa · 반응온도: 실온
- 열불활성화: 65°C, 10 분

### ◆ 응용분야

- Plasmid 내 절단된 DNA 단편 클로닝
- Cohesive 또는 blunt-end DNA에 linker 또는 adaptor DNA 첨가

### ◆ 제품설명

- Gene encoding bacteriophage T4 DNA Ligase는 *E.coli*에서 발현하였으며, 재조합 T4 DNA Ligase를 균일하게 정제하였다. 이 효소는 두 가닥의 DNA에서 절단된 (nicked) 부위의 5'-phosphate와 3'-OH 사이의 공유결합을 촉매한다. 이러한 활성은 제한효소로 절단한 부착말단 (cohesive end) 또는 blunt end에 DNA 단편을 ligation하는데 유용하다. T4 DNA Ligase는 RNA-DNA 혹은 RNA-RNA double helix에서 ligation 효율이 낮다. Single strand DNA 또는 RNA에는 ligation이 불가능하다.

### ◆ Unit정의

- 1 Units는 Hind III로 절단한 DNA를 20 μl reaction mixture (50 mM Tris-HCl/pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 μg/μl BSA, 0.12 μM 5'말단 DNA)를 섞어 반응 시 16°C에서 30분 동안 50%를 붙일 수 있는 효소의 양이다. Cohesive end를 붙이기 위한 1 unit은 0.015 Weiss unit (1 Weiss unit~66 units)과 동일하다.

### ◆ 보관용액

- 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 200 μg/μl BSA, 50% glycerol

### ◆ 주의사항

- 클로닝을 위한 insert DNA농도는 사용할 vector의 양과 같거나 3배 더 많아야 한다.
- 200 mM 혹은 그 이상 농도에서는 NaCl이나 KCl에 의해 T4 DNA Ligase 활성이 저해된다.
- PEG 4000 (final concentration, 5%)을 첨가하여 blunt end DNA의 ligation 효율을 높인다.
- Ligated DNA가 전기충격법으로 *E. coli*에 형질전환 시, ligated DNA는 phenol-chloroform 처리 후 ethanol 침전으로 정제하여야 한다. DNA는 고효율 transformation을 위해 정제수에 녹인다.
- 10X T4 DNA Ligase buffer 내의 고농도 DTT (100 mM)는 낮은 온도에서 침전을 형성할 수 있으므로 사용하기 전에 따뜻하게 하여 완전히 녹인다.

### ◆ 표준반응조건

10X T4 DNA Ligase buffer		2 tube
T4 DNA Ligase (400 unit/μl)	For sticky ends	1 μl
	For blunt ends	2 μl
Vector DNA (50~400 ng/μl)		1 μl
Insert DNA (3X molar excess of vector DNA)		X μl
Distilled water		up to 20 μl

1시간 동안 상온에서 반응시킨다.