



Anwendungen:

- Klonierung von PCR Fragmenten
- Klonierung von Restriktionsfragmenten
- Site-directed Mutagenese
- Selbstzirkulation linearer DNA
- Nick Reperatur in Duplex DNA, RNA oder DNA/RNA Hybriden

Protokoll:

- Pipettieren Sie folgende Reagenzien in ein steriles nukleasefreies Reaktionsgefäß (auf Eis)

Komponente	Volumen
Vektor DNA	x µl (20 – 50 ng)
Insert DNA	y µl (3 -10 Molar zu Vektor)
10x T4 Ligationspuffer	2 µl
ATP Lösung (25 mM)	0.4 – 0.8 µl
T4 DNA Ligase (5U/µl)	1 µl
Nukleasefreies Wasser	auffüllen auf 20 µl

- Vorsichtig mischen
- Inkubation für sticky ends 0.5 – 1 Stunde bei 20-25 °C, für blunt ends 1 – 2 Stunden bei 20 - 25 °C
- Ansatz auf Eis stellen und 1 – 5 µl in 50 µl *E. coli* kompetente Zellen transformieren

Weitere Informationen:

- 10x T4 Ligationspuffer und ATP Lösung bei Raumtemperatur auftauen und resuspendieren
- Für blunt end Ligationen sollte man höhere Mengen an Vektor und Insert DNA verwenden
- Die Effizienz der blunt end Ligation wird durch Zugabe von PEG verbessert. Die empfohlene PEG Konzentration beträgt 5 % (w/v). Es ist zu beachten, dass eine erhöhte PEG Konzentration die Transformationseffizienz herabsetzt.
- Bei einer sticky end Ligation wird empfohlen, den Vektor und die Insert DNA vor dem Ansetzen der Liagtion zu erhitzen.
- Es wird empfohlen die 3-10-fache Menge an Insert in Relation zum Vektor einzusetzen. Berechnung mit folgender Formel:

$$\text{ng (insert)} = \frac{\text{ng (Vektor)} * \text{kb (Insert)} * \text{Molares Verhältnis (Insert:Vektor)}}{\text{kb (Vektor)}}$$

- Inaktivierung der Ligase bei 65 °C (10 min) oder 70 °C (5 min)
- Der Kit enthält:
Ligase T4 (5 U/µl)
Ligationspuffer (10x)
ATP Lösung (25 mM)

Ligase T4	500 U	Kunststoff	3729.1
	2500 U	Kunststoff	3729.2

Ligase T4

5 U/µl, für die Molekularbiologie

Die T4 DNA Ligase ist ein ATP-abhängiges rekombinantes Enzym, das aus *Escherichia coli* isoliert wurde. Verwendet wird die Ligase zur molekularen Klonierung, ortsgerichteten Mutagenese, Nickreparatur in Duplex-DNA, RNA oder DNA/RNA-Hybriden und Ligation-vermittelten PCR.

Die Ligase T4 katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen nebeneinanderliegenden 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Endgruppen in Duplex-DNA oder RNA.

Unit Definition: Eine (Weiss)-Einheit der T4-DNA-Ligase katalysiert die Umwandlung von 1 nmol ³²P aus Pyrophosphat in Norit-adsorbierbares Material in 30 Minuten bei 37 °C.

Lagerpuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 50 % (v/v) Glycerol

10x T4 Ligationspuffer: 660 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM DTT, 100 mM MgCl₂
Der 10x T4 Ligationspuffer enthält kein ATP. Dieses muss separat zugegeben werden. Die finale Konzentration an ATP in der Reaktion sollte 0.5 - 1.0 mM betragen.

Instructions for use



Ligase T4

5 U/μl, for molecular biology

The ligase T4 is an ATP-dependent recombinant enzyme isolated from *Escherichia coli*. The ligase is used for molecular cloning, site-directed mutagenesis, nick repair in duplex DNA, RNA or DNA/RNA hybrids and ligation-mediated PCR. T4 DNA ligase catalyses the formation of a phosphodiester bond between adjacent 5' phosphate and 3' hydroxyl end groups in duplex DNA or RNA.

Unit Definition: A (Weiss) unit of Ligase T4 catalyses the conversion of 1 nmol ³²P from pyrophosphate to norite adsorbable material in 30 minutes at 37 °C.

Storage buffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 50% (v/v) glycerol

10x T4 ligation buffer: 660 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM DTT, 100 mM MgCl₂
The 10x T4 ligation buffer does not contain ATP. This must be added separately. The final concentration of ATP in the reaction should be 0.5 - 1.0 mM.

Applications:

- Cloning of PCR fragments
- Cloning of restriction fragments
- Self-circulation of linear DNA
- Site-directed mutagenesis
- Nick repair in duplex DNA, RNA or DNA/RNA hybrids

Protocol:

- Pipette the following reagents into a sterile nuclease-free reaction tube (on ice)

Component	Volume
Vector DNA	x μl (20 – 50 ng)
Insert DNA	y μl (3 -10 molar to vector)
10x T4 ligation buffer	2 μl
ATP solution (25 mM)	0,4 – 0,8 μl
T4 DNA ligase (5U/μl)	1 μl
Nuclease-free water	up to 20 μl

- Mix gently
- Incubate sticky ends for 0.5 - 1 hour at 20-25 °C and blunt ends for 1 - 2 hours at 20-25 °C
- Cool down on ice and transform 1 - 5 μl into 50 μl *E. coli* competent cells

Further information:

- Thaw and resuspend 10x T4 ligation buffer and ATP solution at room temperature
- For blunt end ligations higher amounts of vector and insert DNA should be used

- The efficiency of the blunt end ligation is improved by the addition of PEG. The recommended PEG concentration is 5 % (w/v). It should be noted that a higher PEG concentration reduces the transformation efficiency.
- For sticky end ligation it is recommended to heat the vector and the insert DNA prior to ligation.
- It is recommended to use 3-10 times the amount of insert in relation to the vector. Calculation using the following formula:

$$\text{ng (insert)} = \frac{\text{ng (vector)} * \text{kb (insert)} * \text{molar ratio (insert:vector)}}{\text{kb (vector)}}$$

- Inactivate ligase at 65 °C (10 min) or 70 °C (5 min)
- The Kit contains:
Ligase T4 (5 U/μl)
Ligation buffer (10x)
ATP solution (25 mM)

Ligase T4	500 U	plastic	3729.1
	2500 U	plastic	3729.2

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe
P.O. Box 100121 • 76231 Karlsruhe
Phone: +49 (0) 721/ 5606-0
Fax: +49 (0) 721/ 5606-149
info@carlroth.com • www.carlroth.com ip 07/2021

The company is a limited partnership with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRA 100055. Roth Chemie GmbH, with headquarters in Karlsruhe, reg. court Mannheim HRB 100428, is the personally liable partner. Managing Director: André Houdelet. Sales tax identification number: DE 143621073.