

Cloned *E. coli* DNA Ligase

Code No. 2160A

Size : 1,000 U

Shipping at – 20°C

Store at – 20°C

Conc. : 60 U/ μ l

Description :

E. coli DNA Ligase catalyze the formation of phosphodiester bonds between 3'-OH termini and 5'-P termini, as does T4 DNA Ligase. Its MW is 77,000 and its optimum reaction pH is 7.5 - 8.0 (Tris-HCl buffer). It requires NAD as the cofactor. T4 DNA Ligase ligates both cohesive and blunt ends, but *E. coli* DNA Ligase can ligate cohesive ends only. In the presence of high concentrations of monovalent cations and PEG, however, *E. coli* DNA Ligase also ligates blunt ends.³⁾ T4 DNA Ligase ligates 5'-P terminal DNA with 3'-OH terminal RNA, 5'-P terminal RNA with 3'-OH terminal DNA, and RNA itself to a small degree. However, *E. coli* DNA Ligase cannot ligate RNA with DNA nor RNA itself.⁴⁾

Storage Buffer :

10 mM	potassium phosphate, pH 7.5
50 mM	KCl
1 mM	DTT
1 mM	EDTA
50%	Glycerol

Source :

Escherichia coli UT481 carrying a plasmid encoding the ligase^{1, 2)}

Unit definition :

One unit is the amount of the enzyme that ligates more than 90% of 6 μ g of λ DNA-Hind III fragments in a 20 μ l mixture in 30 minutes at 16°C.

Reaction mixture for unit definition :

30 mM	Tris-HCl, pH 8.0
4 mM	MgCl ₂
10 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
1.2 mM	EDTA
100 μ M	NAD
0.005%	bovine serum albumin
6 μ g/20 μ l	λ DNA-Hind III digest

Purity :

Nuclease activity is not detected in any of the following cases, as judged from the intact gel electrophoresis pattern :

1. After incubation of 1 μ g of λ DNA-Hind III fragments with 360 units of this enzyme for 16 hours at 37°C.
2. After incubation of 1 μ g of supercoiled pBR322 DNA with 360 units of this enzyme for 16 hours at 37°C
3. After incubation of 1 μ g of 16s and 23s rRNA with 360 units of this enzyme for 1 hours at 37°C.

Applications :

cDNA cloning by the Okayama-Berg method.⁵⁾ The amount of the enzyme used in this method is about 50 units.

Note :

This enzyme is purified from an *E. coli* overproducing strain, and is has very little contaminants. Although this means that its concentration is high, there should be no problem caused by an excess amount of the enzyme being used.

Application Example :

30 mM	Tris-HCl, pH 8.0
4 mM	MgCl ₂
10 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
1.2 mM	EDTA
100 μ M	NAD
0.005%	bovine serum albumin
1 μ g	DNA
60 U	<i>E. coli</i> DNA Ligase
Sterile purified water	up to 20 μ l



incubate at 16°C for 1 hour- overnight

References :

- 1) Isino Y, Shinagawa H, Makino K, Tsunasawa S, Sakiyama F, and Nakata A. *Molec Gen Genet.* (1986) **204**: 1-7.
- 2) Panasencko S M, Alazard R J, and Lehman I R. *J Biol Chem.* (1987) **253**: 4590-4592.
- 3) Hayashi K, Nakazawa M, Ishizaki Y, Hiraoka N, and Obayashi A. *Nucleic Acids Res.* (1985) **13**: 7979-7992.
- 4) Engler M J and Richardson C C. *in The Enzyme.* (1982) **15**: 3-29.
- 5) Okayama H and Berg P. *Mol Cell Biol.* (1982) **2**: 161-170.
- 6) Gubler U and Hoffman B J. *Gene.* (1983) **25**: 263-269.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TAKARA BIO INC.

If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6973 or from our website at www.takara-bio.com.

Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements.

All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

Cloned *E. coli* DNA Ligase

Code No. 2160A

Size : 1,000 U

Shipping at -20°C

Store at -20°C

濃度 :

60 U/ μl

● 製品説明

本酵素は隣接した DNA 鎖の 5'-P 末端と 3'-OH 末端をフォスフォジエステル結合で連結する酵素である。分子量約 77,000、至適 pH は pH7.5 ~ 8.0 (Tris-HCl Buffer)、補酵素として NAD を要求する。本酵素は突出末端どうししか連結できない。しかし、PEG と高濃度一価カチオン存在下では平滑末端を連結することも可能である。³⁾ また、RNA と DNA の末端、および RNA どうしは連結できない。⁴⁾

● 形状

10 mM	リン酸カリウム、pH7.5
50 mM	KCl
1 mM	DTT
1 mM	EDTA
50%	グリセロール

● 起源

Escherichia coli UT481 carrying a plasmid encoding the ligase ^{1, 2)}

● 活性の定義

6 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ の λ DNA-Hind III 分解物を 16°C で 30 分間に 90% 以上ライゲーションさせる酵素活性を 1 U とする。

● 活性測定用反応液組成

30 mM	Tris-HCl, pH8.0
4 mM	MgCl ₂
10 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
1.2 mM	EDTA
100 μM	NAD
0.005%	BSA
6 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$	λ DNA-Hind III 分解物

● 純度

- 360 U の本酵素と、1 μg の λ DNA-Hind III 分解物とを 37°C 、16 時間反応させても、DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。
- 360 U の本酵素と、1 μg の supercoiled pBR322 DNA とを 37°C 、16 時間反応させても、DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。
- 360 U の本酵素と、1 μg の 16S と 23S-r RNA を 37°C 、1 時間反応させても、RNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。

● 用途

Okayama-Berg 法⁵⁾ や Gubler-Hoffman 法⁶⁾ による cDNA 合成の際 Second strand 合成 (Okayama-Berg 法における使用量は約 50 U、Gubler-Hoffman 法における使用量は約 1.5 U)。

● 使用上の注意

本酵素は、大腸菌の過剰生産組換え体から精製され、夾雑物をほとんど含まない、極めて純度の高い製品となっている。そのため高濃度であるが、大量に用いても全く問題はない。

● 反応例

30 mM	Tris-HCl, pH8.0
4 mM	MgCl ₂
10 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
1.2 mM	EDTA
100 μM	NAD
0.005%	BSA
1 μg	DNA
60 U	<i>E. coli</i> DNA Ligase
滅菌精製水	up to 20 μl

↓
 16°C で 1 時間 ~ Overnight 反応させる。

● 参考文献

- Isino Y, Shinagawa H, Makino K, Tsunasawa S, Sakiyama F, and Nakata A. *Molec Gen Genet.* (1986) **204**: 1-7.
- Panasenko S M, Alazard R J, and Lehman I R. *J Biol Chem.* (1987) **253**: 4590-4592.
- Hayashi K, Nakazawa M, Ishizaki Y, Hiraoka N, and Obayashi A. *Nucleic Acids Res.* (1985) **13**: 7979-7992.
- Engler M J and Richardson C C. *in The Enzyme.* (1982) **15**: 3-29.
- Okayama H and Berg P. *Mol Cell Biol.* (1982) **2**: 161-170.
- Gubler U and Hoffman B J. *Gene.* (1983) **25**: 263-269.

● 注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。