**Απομόνωση φυτικής DNA λιγάσης**

1. Ένα δέκατο του gr (0.1 gr) φυτικού ιστού ομογενοποιείται σε 500 μl ρυθμιστικό διάλυμα 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100mM NaCl, 1 mM EDTA, 10mM μερκαπτοαιθανόλης.
2. Φυγοκέντρηση στα 10.000 xg, επί 5 min προς απομάκρυνση των στερεών υλικών. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλον σωλήνα.
3. Προστίθενται 333 μl κεκορεσμένο διάλυμα θειϊκού αμμωνίου (NH4)2SO4, ώστε να προκύψει διάλυμα 40% κορεσμένο σε (NH4)2SO4. Μετά από ½ h το παρασκεύασμα θολώνει λόγω σχηματισμού σωματιδίων αδιάλυτων πρωτεϊνών.
4. Φυγοκέντρηση στα 10.000 xg, επί 5 min προς απομάκρυνση των αδιάλυτων πρωτεϊνών. Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό σωλήνα.
5. Προσθήκη στο υπερκείμενο ακόμη 333 μl κορεσμένου (NH4)2SO4. Τώρα το παρασκεύασμα είναι 70% κορεσμένο σε (NH4)2SO4.
6. Μετά ½ h φυγοκέντρηση στα 10.000 xg, επί 5 min προς καθίζηση των νέων αδιάλυτων πρωτεϊνών, όπου περιέχεται και η DNA λιγάση.
7. Διάλυση του ιζήματος σε 500 μl 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, προσθήκη λίγης (1-2 mg) Al2O3 πορώδη, νανο-σωματιδιακή (alumina Cγ). Ανάμιξη, φυγοκέντρηση, πλύσιμο ιζήματος αλούμινα με 500 μl 100 mM (NH4)2SO4, pH 7.5, φυγοκέντρηση, έκλυση πρωτεϊνών από το ίζημα με 500 μΜ φωσφορικό μπάφερ pH 7.5, απομάκρυνση της αλούμινα με φυγοκέντρηση, καθίζηση των πρωτεϊνών του υπερκειμένου με προσθήκη 667 μl κορεσμένου (NH4)2SO4, φυγοκέντρηση για συλλογή των πρωτεϊνων σαν ίζημα (περιλαμβάνουν και την DNA λιγάση).
8. Διάλυση του ιζήματος σε 500 μl 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, προσθήκη λίγης κυτταρίνης-DEAE, ανάμιξη, φυγοκέντρηση, πλύση του ιζήματος με 500 μl 200 mM φωσφορικού αμμωνίου pH 7.5, φυγοκέντρηση, εξαγωγή των πρωτεϊνών από το ίζημα με 500 μl 500 mM φωσφορικού αμμωνίου pH 7.5, φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο περιέχει και DNA λιγάση. Προσθήκη 667 μl κορεσμένου (NH4)2SO4, φυγοκέντρηση για συλλογή των πρωτεϊνων σαν ίζημα (περιλαμβάνουν και την DNA λιγάση).
9. Διάλυση του ιζήματος σε 500 μl 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου, pH 7.5, προσθήκη λίγης φωσφοκυτταρίνης, ανάμιξη, πλύση του ιζήματος με 500 μl 500 mM διαλύματος φωσφορικού καλίου, pH 7.5, φυγοκέντρηση, εξαγωγή των πρωτεϊνών από το ίζημα με 500 μl 50 mM διαλύματος φωσφορικού καλίου, pH 7.5, 350 mM KCl, φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο περιέχει και DNA λιγάση.
10. Προσθήκη στο υπερκείμενο 120 μl γλυκερόλης (20% τελική συγκέντρωση), αποθήκευση στους -20οC.