



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301 或 800-8283301
 订货 e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

T4 RNA Ligase 2 (dsRNA Ligase)

产品编号	产品名称	包装
R0632S	T4 RNA Ligase 2 (dsRNA Ligase)	1000U

产品简介:

- 碧云天生产的T4 RNA Ligase 2, 即T4 RNA连接酶2, 是一种ATP依赖的双链RNA连接酶(double-strand RNA ligase, dsRNA Ligase), 也被称为T4 Rnl2 (gp24.1), 可以用于双链RNA进行分子内的环化连接和分子间的线性连接。T4 RNA Ligase 2与T4 RNA Ligase 1 (R0621)不同的是, 对双链RNA中的缺刻(nick)的连接活性要大大高于对单链RNA末端的连接活性。T4 RNA Ligase 2也可用于双链核酸(RNA双链、RNA/DNA杂合链和/或DNA双链)分子内或分子间RNA链的3' 羟基和DNA链的5' 磷酸基的连接。T4 RNA Ligase 2连接时需要5' 磷酸和3' 羟基的存在, 可以是RNA链或DNA链的5' 磷酸基和RNA链的3' 羟基之间发生连接反应。
- T4 RNA Ligase 2催化dsRNA粘端连接的反应过程如下。首先T4 RNA Ligase 2直接消耗ATP, 形成中间产物T4 RNA Ligase 2-AMP, 并释放焦磷酸; 接着, T4 RNA Ligase 2-AMP与dsRNA的缺刻处相结合, 并将AMP从中间产物T4 RNA Ligase 2-AMP中转移至dsRNA缺刻处的5' 磷酸末端, 形成腺苷酰化缺刻dsRNA中间产物; 最后, 在T4 RNA Ligase 2的催化下, dsRNA缺刻处的3' 羟基进攻该缺刻处的5' 磷酸基团, 形成3' -5' 磷酸二酯键, 并释放出AMP。
- 本产品酶活性高, 连接效率高于国外同类竞争产品。本产品催化双链RNA粘端连接的效果请参考图1。

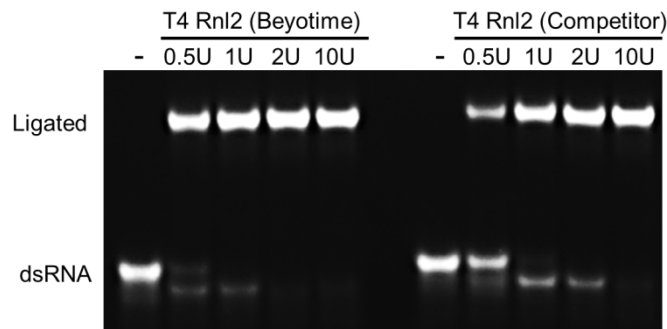


图1. 碧云天生产的T4 RNA Ligase 2和N公司的同类产品(Competitor T4 RNA Ligase 2)催化连接dsRNA粘端连接的效果图。RNA-1 : 5' -OH-GGGCUUUGCGUGGGUUU-OH-3' ; RNA-2 (5' 端磷酸化) : 5' -pCUAUAGAAACCCACGCAAAGCCC-OH-3' , 使用碧云天的R0051 Annealing Buffer for RNA oligos (5X), 参考说明书进行退火反应。退火获得的dsRNA, 在20μl反应体系中加入图中指定量的本产品或国外N公司的T4 RNA Ligase 2 (T4 Rnl2), 37°C孵育30min进行连接反应, 反应完毕后立即取样用15%非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析。如图所示, 本产品与N公司的产品相比, 实际的连接效率约为N公司产品的2倍, 在本反应体系中碧云天生产的T4 RNA Ligase 2仅需2U就可以非常充分地完成连接反应。

- **用途:** 主要用于连接双链RNA中缺刻的连接(即双链RNA的粘端连接), 也可用于双链结构中, RNA 3' 羟基与DNA 5' 磷酸基的缺刻连接。
- **来源:** 大肠杆菌表达的重组蛋白, 表达基因为T4嗜菌体T4 RNA ligase 2。
- **活性单位定义:** One unit is defined as the amount of enzyme required to ligate 0.4 μg of an equimolar mix of a 23-mer and 17-mer RNAs in a total reaction volume of 20 μl in 30 minutes at 37°C.
- **活性检测条件:** 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 400 μM ATP, 37°C孵育30min。
- **纯度:** 不含DNA内切酶和外切酶, 不含RNA酶, 不含磷酸酯酶。
- **酶储存溶液:** 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 50 mM KCl, 35 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 50% (v/v) Glycerol.
- **10X Reaction Buffer:** 500 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25°C), 20 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 4 mM ATP.
- **失活或抑制:** 85°C加热5min可使T4 RNA Ligase 2失活, 或加入蛋白酶K或EDTA可抑制其活性。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R0632S-1	T4 RNA Ligase 2 (10U/μl)	100μl
R0632S-2	10X T4 Rnl2 Reaction Buffer	250μl
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 至少一年有效。

注意事项:

- 如果连接底物为ssRNA, 推荐使用碧云天生产的R0621 T4 RNA Ligase 1等系列产品。
- 可根据具体应用选择合适的操作方法, 可能需准备额外的试剂, 如RNase Inhibitor、DEPC水等。
- 本产品提供的T4 Rnl2 Reaction Buffer (10X)适用于RNA双链中缺刻的连接反应。如果用于RNA/DNA杂合链中RNA 3' 羟基与DNA 5' 磷酸基的缺刻连接时, 需要将反应体系中的MgCl₂的终浓度提高至10mM, 并在反应体系中加入终浓度为10-15%的PEG8000, 这样可以显著提高酶活性, 同时不影响反应特性。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 双链 RNA 或 DNA/RNA 杂合双链的退火。

将两条单链 RNA 等摩尔数混合, 推荐的终浓度为 20 μ M (10-50 μ M 均可), 90°C 孵育 1min, 然后通过梯度降温至 25°C 退火形成 dsRNA。推荐使用碧云天生产的 R0051 Annealing Buffer for RNA oligos (5X), 并按照该产品使用说明进行退火反应。DNA 和 RNA 杂合链的退火也可以参考双链 RNA 的退火条件进行。退火后的双链推荐在-80°C 保存。

2. 对于双链 RNA 缺刻的连接, 参考下表在冰浴中配制如下反应体系:

Reagent	Volume	Final Concentration
DEPC-treated Water	16 μ l	-
Nicked dsRNA Substrate (20 μ M)	1 μ l	1 μ M
10X T4 Rnl2 Reaction Buffer	2 μ l	1X
T4 RNA Ligase 2 (10U/ μ l)	1 μ l	0.5U/ μ l
Total Volume	20 μ l	-

注意:

- 由于涉及RNA操作, 需要严格按照RNA操作的规范进行, 避免RNase污染, 相关试剂和耗材需要经过DEPC处理去除RNase或者确保是RNase free的。本反应体系中涉及双链RNA, 双链RNA可以耐受RNase A和T1等。如果涉及单链RNA, 包括双链退火后存在部分RNA序列是单链的情况, 推荐适量添加R0102 RNase Inhibitor。
 - 如果同时进行多个连接反应, 可以把上表中除Nicked dsRNA Substrate之外的所有溶液和酶提前预混合, 然后再分装到各反应管内。
 - 反应体系中的Nicked dsRNA Substrate的最终浓度可以达到1 μ M, 在该反应体系中可以确保充分连接。实际使用过程中, 例如由于底物量有限等原因, 可以适当减少Nicked dsRNA Substrate的用量, 例如使最终浓度为0.5 μ M或0.2 μ M等。
- ### 3. 对于RNA/DNA杂合链中RNA 3' 羟基与DNA 5' 磷酸基的缺刻连接, 参考下表在冰浴中配制如下反应体系:

Reagent	Volume	Final Concentration
DEPC-treated Water	10.4 μ l	-
Nicked DNA/RNA Substrate (20 μ M)	1 μ l	1 μ M
10X T4 Rnl2 Reaction Buffer	2 μ l	1X
PEG8000 (50%, RNase Free)	4 μ l	10%
MgCl ₂ (100mM, DEPC-treated)	1.6 μ l	8mM
T4 RNA Ligase 2 (10U/ μ l)	1 μ l	0.5U/ μ l
Total Volume	20 μ l	-

注意:

- 由于涉及RNA操作, 需要严格按照RNA操作的规范进行, 避免RNase污染, 相关试剂和耗材需要经过DEPC处理去除RNase或者确保是RNase free的。本反应体系中涉及双链RNA, 双链RNA可以耐受RNase A和T1等。如果涉及单链RNA, 包括双链退火后存在部分RNA序列是单链的情况, 推荐适量添加R0102 RNase Inhibitor。
 - 如果同时进行多个连接反应, 可以把上表中除Nicked DNA/RNA Substrate之外的所有溶液和酶提前预混合, 然后再分装到各反应管内。
 - 反应体系中的Nicked dsRNA Substrate的最终浓度可以达到1 μ M, 在该反应体系中可以确保充分连接。实际使用过程中, 例如由于底物量有限等原因, 可以适当减少Nicked dsRNA Substrate的用量, 例如使最终浓度为0.5 μ M或0.2 μ M等。
- ### 4. 连接反应: 37°C孵育30min。如果发现效果欠佳可以尝试25°C孵育2h。为了使连接反应更加充分, 可以适当延长连接反应时间。
- ### 5. 终止反应: 反应结束后加入蛋白酶K或EDTA, 即可终止反应。

由于T4 RNA Ligase 2热失活需要85°C加热5min, 这样可能导致dsRNA或DNA/RNA杂合双链变性, 因此通常不建议通过加热方式失活T4 RNA Ligase 2。如果后续无需保持双链状态, 则推荐85°C加热5min以失活T4 RNA Ligase 2。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
------	------	----

R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
R0051	Annealing Buffer for RNA Oligos (5X)	1ml
R0056-2ml	PEG8000 (50%, RNase free))	2ml
R0058-1ml	MgCl ₂ (100mM, DEPC-treated)	1ml
R0102-2kU	RNase Inhibitor	2000U
R0102-10kU	RNase Inhibitor	10000U
R0102-50kU	RNase Inhibitor	50000U
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0125	RNase, DNase and DNA Away	250ml
R0127	RNase, DNase, RNA and DNA Away	250ml
R0621S	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase, 10U/μl)	1000U
R0621M	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase, 10U/μl)	5000U
R0632S	T4 RNA Ligase 2 (dsRNA Ligase)	1000U
R0635S	T4 RNA Ligase 2, truncated	5kU
R0635M	T4 RNA Ligase 2, truncated	20kU
R0635L	T4 RNA Ligase 2, truncated	100kU
R0700S	小RNA 3' 接头(5' 腺苷化, 3' 封闭)及连接试剂盒	20次
R0702S	Universal miRNA Cloning Linker (5'腺苷化3'封闭)	1μg
R0702M	Universal miRNA Cloning Linker (5'腺苷化3'封闭)	5μg
R0716S	5' DNA Adenylation Kit	10次
R0716M	5' DNA Adenylation Kit	50次
ST1249-2ml	DEPC (≥97%, Reagent grade)	2ml
ST1249-10ml	DEPC (≥97%, Reagent grade)	10ml
ST036	DEPC	10g

Version 2020.03.09