

5'端 DNA/RNA 腺苷酰化酶

D743509

本公司生产的 5' 端 DNA/RNA 腺苷酰化酶，即 5' DNA/RNA Adenylase，也称 Single-Strand Nucleic Acid 5' Adenylase 或单链核酸 5'端腺苷酰化酶，可以催化 5'端磷酸化的单链 DNA 或单链 RNA (pDNA or pRNA)转换生成 5'端腺苷酰化 DNA (AppDNA)或 5'端腺苷酰化 RNA (AppRNA)。无论作为底物的 DNA 或 RNA 的 3'端是否进行了氨基化等封闭，使用本产品都可以高效催化产生 5'端腺苷酰化产物。在反应体系中不存在 ATP 的条件下，本产品还可以催化 5' 端磷酸化的单链 DNA (pDNA) 生成环状 DNA (circular DNA)。5' DNA/RNA Adenylase 进行 5'端腺苷酰化修饰反应时，需要 ATP 和待腺苷酰化修饰的 5'端磷酸化的单链 DNA 或单链 RNA。5' DNA/RNA Adenylase 催化单链核酸 5'端腺苷酰化反应的原理如下：以 5'端磷酸化的单链 DNA 或单链 RNA 为底物，本产品首先将 ATP 分解成 AMP 和 PPi，接着 AMP 转移到单链 DNA 或单链 RNA 的 5'磷酸基团上，之后形成腺苷酰化单链 DNA 或单链 RNA，从而生成腺苷酰化产物。

来源 (Source)	大肠杆菌重组表达
外观 (Appearance)	无菌液体
保存液 (Storage Buffer)	10 mM Tris-HCl,100 mM NaCl,1 mM DTT,0.1 mM EDTA,50% Glycerol,0.1% (w/v) Triton X-100,pH 7.5 @ 25°C
酶浓度 (Enzyme Concentration)	75U/μl
纯度 (Purity)	不含 DNA 内切酶和外切酶，不含核糖核酸酶。
活性定义 (Activity Definition)	One unit is the amount of enzyme required to catalyze the transfer of 1pmol of AMP to pDNA substrate in a total reaction volume of 20 μl in 15 minutes at 65°C.

组分和说明

Component	3KU	5*3KU	Storage
5' DNA/RNA Adenylase (75U/μl)	40μl	5*40μl	-20°C. Avoid freeze/thaw cycle.
10X Adenylase Reaction Buffer	100μl	5*100μl	-20°C. Avoid freeze/thaw cycle.

产品应用

制备 5'端腺苷酰化的单链 DNA 接头，最终用于 miRNA 等 3'端为羟基的 RNA 或 3'端为羟基的单链 DNA 在克隆、高通量测序建库或 PCR 检测等时，在 3'端添加的接头。

产品优势

本产品可以高效催化产生 5'端腺苷酰化产物。在反应体系中不存在 ATP 的条件下, 本产品还可以催化 5'端磷酸化的单链 DNA (pDNA)生成环状 DNA (circular DNA)。

使用说明

1.解冻 5'端腺苷酰化修饰反应所需的各种试剂, 将 5' DNA/RNA adenyase 置于冰上或冰盒内。

2.参考下表在冰浴中配制如下反应体系:

Reagent	Volume	Final Concentration
Water (DNase/RNase free)	14 μ l	-
ssDNA or ssRNA (100 μ M)	1 μ l	5 μ M
10X Adenyase Reaction Buffer	2 μ l	1X
ATP (1mM)	2 μ l	0.1mM
5' DNA/RNA adenyase (75U/ μ l)	1 μ l	3.75U/ μ l
Total Volume	20 μ l	-

注 1: 如果同时进行多个腺苷酰化反应, 可以把上表中除 ssDNA 或 ssRNA 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。

注 2: 如果涉及 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。如果涉及单链 RNA, 推荐适量添加 RNase Inhibitor。

3.腺苷酰化反应: 65°C 孵育 1h。为了使连接反应更加充分, 可以适当延长反应时间。

4.终止反应: 85°C 孵育 5min 以终止反应。

5.腺苷酰化产物的电泳鉴定: 电泳上样前 95°C 孵育 5min 随后置于冰浴, 以充分变性。尿素(7M)变性聚丙烯酰胺凝胶(15%)进行凝胶电泳分析。腺苷酰化修饰后分子量会变大一点。

6.浓缩及后续用途: 可以采用常规的乙醇沉淀方法进行浓缩, 后续可以使用 T4 RNA Ligase2, truncated (200U/ μ l)等用于和小 RNA 等的 3'羟基的连接反应。

保存条件:

长期储存-20°C (24 个月); 避免反复冻融。

注意事项:

(1) 底物单链 DNA 或单链 RNA 的 5'端磷酸化是必须的, 3'端可以进行氨基化等封闭, 也可以不封闭; 不进行 3'端氨基化等封闭时, 建议将 ATP 的浓度增加至 0.5mM, 可以避免底物发生环化或串联反应。

(2) 5' DNA/RNA adenyase 不能连接双链 DNA (dsDNA)之间的缺刻。5' DNA/RNA adenyase 的最佳反应温度为 65°C, 并且在 25°C 时会出现去腺苷酰化现象, 因此反应完成后推荐在 85°C 孵育 5min 以失活 5' DNA/RNA adenyase。如果没有充分失活 5'



DNA/RNA adenylase, 后续经历室温温度条件时, 会导致腺苷酰化比例下降。

(3) 5' DNA/RNA adenylase 使用时宜存放在冰盒内或冰浴上, 使用完毕后宜立即放置于-20℃保存。

(4) 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。

(5) 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

