

## T4 RNA 连接酶 2, 截短型

### T750874

#### 产品简介

本公司生产的 T4 RNA 连接酶 2, 截短型(T4 RNA Ligase 2, truncated), 该酶仅包含 T4 RNA 连接酶 2N 端 249 个氨基酸, 可特异性地将 5'端预腺苷酰化的 DNA 或 RNA (App-DNA 或 App-RNA)连接到 RNA 的 3'羟基。T4 RNA Ligase 2, truncated 与 T4 RNA Ligase 2 的酶活性完全不同, 后者是一种 ATP 依赖的 dsRNA ligase, 而前者是一种不依赖于 ATP 的, 依赖于 5'端预腺苷酰化的单链核酸连接酶。T4 RNA Ligase 2, truncated 常用 micro-RNA (miRNA)等 3'端为羟基的单链 RNA 在克隆、高通量测序建库或 PCR 检测等时, 在 3'羟基端添加 5'端预腺苷酰化的 DNA 或 RNA 接头。T4 RNA Ligase 2, truncated 只能利用 5'端预腺苷酰化的单链 DNA 或 RNA 作为 3'端接头, 因此可以大大降低连接反应的背景, 通常是小 RNA 等建库时的优先选择。T4 RNA Ligase 2, truncated 连接时不需要 ATP, 但需要 5'端预腺苷酰化(也称预腺苷化、腺苷酰化或腺苷化)底物。即使在有 ATP 存在的情况下, T4 RNA Ligase 2, truncated 也不能催化连接单链 DNA 或 RNA 5'-P 末端与 3'-OH 末端之间形成磷酸二酯键。而 T4 RNA Ligase 1 可以在 ATP 存在的情况下, 催化连接单链 DNA 或 RNA 5'-P 末端与 3'-OH 末端之间形成磷酸二酯键。因此 T4 RNA Ligase 2, truncated 特别适用于 small RNA library 的制备, 不管是进行 miRNA 的测序还是进行 directional mRNA-Seq, 该酶都可以提高建库的质量, 并有效降低连接反应的背景。

来源 (Source)	大肠杆菌重组表达
外观 (Appearance)	无菌液体
保存液 (Storage Buffer)	10mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT, 50%(v/v) Glycerol.
酶浓度 (Enzyme Concentration)	200U/μl
纯度 (Purity)	无 DNA 内切酶和外切酶活性, 无 RNA 酶活性, 无蛋白酶活性
活性定义 (Activity Definition)	200 units is defined as the amount of enzyme required to give 80% ligation of a 31-mer RNA to the pre-adenylated end of a 17-mer DNA in a total reaction volume of 20μl in 1 hour at 25°C.

#### 组分和说明

T750874A	T4 RNA Ligase 2, truncated (200U/μl)	25μl	4*25μl	20*25μl	-20°C. Avoid freeze/thaw cycle.
T750874B	10X T4 Rnl2, truncated Buffer	75μl	4*75μl	20*75μl	-20°C. Avoid freeze/thaw cycle.

T750874C	PEG8000 (50%, RNase free)	400μl	4*400μl	20*400μl	-20°C. Avoid freeze/thaw cycle.
----------	---------------------------	-------	---------	----------	---------------------------------

### 储存条件

-20°C 保存, ≤0°C 运输。

### 产品应用

5'末端预腺苷酰化的单链 DNA 或者 RNA 与单链 RNA 的 3'羟基末端连接; cDNA 文库构建中连接 5'末端预腺苷酰化单链寡核苷酸和小 RNA; 链特异性的 cDNA 文库 (strand-specific cDNA library) 构建中连接 5'末端预腺苷酰化单链寡核苷酸和 RNA; 二代测序中, miRNA 文库构建中 RNA 的 3'末端与接头之间的连接; cDNA 文库的构建以进行小 RNA 转录组分析 (small-RNA transcriptome analysis)。

### 产品优势

T4 RNA Ligase 2, truncated 常用于 microRNA (miRNA) 等 3'端为羟基的单链 RNA 在克隆、高通量测序建库或 PCR 检测等时, 在 3'羟基端添加 5' 端预腺苷酰化的 DNA 或 RNA 接头。

### 使用说明

1. 用于连接 5'端腺苷酰化并且 3'端不是羟基的(例如为氨基)单链 DNA (AppDNA-NH<sub>2</sub>)和 3'端为羟基的单链 RNA (ssRNA) 的使用说明具体如下。需要提前准备好待连接的样品, 以及 Universal miRNA Cloning Linker 或自备的适当接头。

2. 参考下表在冰浴中配制如下反应体系:

Reagent	Volume	Final Concentration
ssRNA	xμl	0.5 or 1μM
DEPC-treated Water	(4-x-y)μl	-
Universal miRNA Cloning Linker	yμl	1 or 0.5, or 2 or 1μM
PEG8000 (50%, RNase Free)	12μl	0.3
10X T4 Rnl2, truncated Buffer	2μl	1 X
RNase Inhibitor (40U/μl)	1μl	2U/μl
T4 RNA Ligase2, truncated (200U/μl)	1μl	10U/μl
Total Volume	20μl	-

### 注意:

a. 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。推荐在连接体系中添加 RNase Inhibitor, 以避免 ssRNA 或其连接产物的降解, 尽管经测试我们发现在严格操作 的情况下, 不加 RNase Inhibitor 也不会导致 ssRNA 或其连接产物发生明显降解。

b. 进行连接反应时, 如果样品 RNA 比较珍贵, 希望充分被连接, 可以按照接头和样品 RNA 的摩尔比为 2:1 的比例进行连接; 如果样品 RNA 比较充裕, 同时感觉接头的成本偏高时, 可以按照接头和样品 RNA 的摩尔比 1:1 甚至 1:2 的比例进行连接反应, 这样可以很好地节省接头。ssRNA 的用量可以根据实际的样品量进行适当调节, 相应的接头的用量也按照比例进行适当调整即可。

c. 如果同时进行多个连接反应, 可以把上表中除 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。

3. 连接反应: 25°C, 孵育 60min。为了使连接反应更加充分, 可以适当延长连接反应时间。

4. 终止反应: 65°C, 孵育 20min。

## 注意事项:

1. 本产品提供的试剂均用不含 DNA 酶和 RNA 酶的水配制, 可直接用于 3'端为羟基的单链 RNA 和 5'端腺苷酰化的 DNA 或 RNA 之间的连接反应。
2. 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。
3. 使用本产品连接 ssRNA 和 AppDNA 时, 建议使用的 PEG8000 的浓度为 10%-30%, 适当提高 PEG8000 的浓度, 会显著提高 T4 Rnl2, truncated 的催化的连接效率, 而不改变其反应特性。
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。