



T4 RNA Ligase 1

货号: T5204S

存储条件: -20°C, 2年有效

产品说明

T4 RNA Ligase 1 是一种来源于 T4 噬菌体的 ATP 依赖性连接酶, 主要催化单链 RNA 或单链 DNA 分子间或分子内 5'-磷酸基团与 3'-羟基之间形成磷酸二酯键, 该过程伴随着 ATP 水解为 AMP 和 P_{pi}。T4 RNA Ligase1 对不同底物连接效率有显著区别: SSRNA>SSRNA>SSRNA>SSDNA>SSDNA>SSDNA。此外, T4RNALigase1 也可用于 RNA 和单核苷酸之间的连接, 单核苷酸必须为 5'和 3'均磷酸化的形式, 常用于 RNA 的 3'末端标记。

产品组分

组分	1000U	5000U
T4 RNA Ligase 1 (10 U/μl)	100 μl	500 μl
10× T4 Rnl1 Buffer	1.5 ml	1.5 ml
50% PEG 8000 (RNase-free)	1 ml	2×1 ml
ATP (10 mM)	200 μl	1 ml

酶活定义

一个单位定义为在 37°C下, 30 min 内将 1 nmol 荧光标记的 rA16 转化为具有磷酸酶抗性的形式所需的酶量

应用

1. RNA 环化、RNA 文库构建;
2. 标记具有 5'-[³²P] pCp 的 RNA 3' 末端;
3. 在蛋白中掺入非天然氨基酸;
4. 单链 Oligo RNA 及 Oligo DNA 合成。

质量控制

蛋白纯度

经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 蛋白纯度不低于 95%。

非特异性内切酶活性

37°C 下, 在 20μ反应体系中将 10UT4 RNA Ligase1 与 200ng 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 少于 20% 的

质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

DNase 活性

37°C下, 在 20 μ反应体系中将 10 UT4 RNA Ligase1 与 15ng 双链 DNA 片段共同温育 16 h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 双链 DNA 片段无变化。

RNase 活性

37°C下, 在 10μ反应体系中将 10 UT4 RNA Ligase1 与 500ng RNA 共同温育 1h, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 超过 90% 的 RNA 保持完整。

使用方法

1. ssRNA 环化连接反应

① 于冰上配制如下反应体系:

试剂	使用量
ssRNA ^a	10 pmol
10× T4 Rnl1 Buffer	2 μl
T4 RNA Ligase 1 (10 U/μl)	1 μl
ATP (稀释至 1 mM) ^b	1 μl
RNase Inhibitor, Murine (40 U/μl) (可选)	0.5 μl
Nuclease-Free Water	To 20 μl

a. 在样品比较少的情况下, 可以大幅减少 ssRNA 的用量;

b. 产品附带的 ATP 用于环化反应时浓度过高, 需要稀释后使用。

② 37°C 孵育 30 min。在连接效果不佳时可尝试 25°C 孵育 1~2 h 或 16°C 过夜以获得最佳连接效果。

③ 65°C 孵育 15 min 终止反应。

2. 单链 RNA 或 DNA 的分子间连接反应

① 于冰上配制如下反应体系:

试剂	使用量
ssRNA or ssDNA ^c	10 pmol
10× T4 Rnl1 Buffer	2 μl
T4 RNA Ligase 1 (10 U/μl)	1 μl
50% PEG 8000d	6~10ul
ATP (稀释至 1 mM) ^b	1 μl
RNase Inhibitor, Murine (40 U/μl) (可选)	0.5 μl
Nuclease-Free Water	To 20 μl

c. 用于分子之间的连接, 通常提供 5'磷酸的核酸 3'羟基需要被封闭 (例如氨基修饰), 提供 3'羟基的核酸 5'端需要被封闭 (例如 5'端为羟基)。





d. 如果提供 3'羟基的核酸的量有所不足, 提供 5'磷酸的核酸的用量可以是提供 3'羟基的核酸的 2 倍左右;

e. PEG8000 的终浓度可以在 15%~25% 范围内根据连接效果适当调节。

② 37°C 孵育 30 min。在连接效果不佳时可尝试 25°C 孵育 1~2 h 或 16°C 过夜以获得最佳连接效果。

③ 65°C 孵育 15 min 终止反应。

3. RNA 3' 末端标记

① 于冰上配制如下反应体系:

试剂	使用量
ssRNA	1ug
10× T4 Rnl1 Buffer	3 μ l
T4 RNA Ligase 1 (10 U/ μ l)	1 μ l
ATP (10mM)b	3 μ l
[³² P] pCp	终浓度 1uM
DMSO	终浓度 10%
Nuclease-Free Water	To 30 μ l

② 16°C 过夜; ③ 65 °C 孵育 15 min 终止反应。

注意事项

1. 无论底物是单链 RNA 还是单链 DNA, 需确保 5'末端磷酸化或腺苷酰化, 3'末端是羟基;
2. 该酶无法连接双链 DNA 或 RNA;
3. 涉及 RNA 的操作需严格避免 RNase 污染, 可在反应体系中加入适量 RNase Inhibitor (REF: R2000)防止 RNA 降解;
4. 用于 RNA 3'末端标记时需添加终浓度 10%的 DMSO。

