

# 使用说明书

## T4 RNA Ligase 1 (10U/μl)

Cat. No. PC063(1000 U)、PC064(5000 U)

| 产品内容                              | 产品编号     | 规格     |
|-----------------------------------|----------|--------|
| T4 RNA Ligase 1 (10U/μl)          | PC063-01 | 100 μl |
| 10x T4 RNA Ligase Reaction Buffer | PC063-02 | 500 μl |
| PEG-8000 (50%)                    | PC063-03 | 1 ml   |

保存条件：-20℃保存 12 个月，请注意避免反复冻融。

### ■ 产品说明

T4 RNA Ligase 1,即T4 RNA连接酶1，是一种ATP-依赖的可催化单链RNA、单链DNA或单核苷酸分子间或分子内5'-P末端与3'-OH末端之间形成磷酸二酯键的酶。

T4 RNA Ligase 1可进行RNA之间的连接(效率最高)，单链DNA与单链RNA之间的连接(效率不高)，也可用于单链DNA之间的连接(效率很低)。在用于DNA和RNA之间的连接时，DNA提供5'磷酸基团，RNA提供3' 羟基连接效率较高，而DNA提供3'羟基，RNA提供5' 磷酸基团连接效率低。

T4 RNA Ligase 1不仅可以进行RNA分子间的连接，也可以进行RNA分子(最短8个碱基)的环化连接，还可以用于RNA和单核苷酸之间的连接，此时常用于RNA的3'末端标记。另外，还可以用于DNA的环化连接，例如5' RACE中的cDNA环化。

### ■ 来源

大肠杆菌菌株，携带有 T4 RNA 连接酶 I 基因。

### ■ 活性定义

1 单位指在 37℃ 条件下，30 分钟内将 1 nmol 5'-[32P]rA16 转化为具有磷酸酶抗性的形式所需的酶量。

### ■ 品质保证

不含DNA内切酶和外切酶，不含RNA酶，不含磷酸酯酶。

### ■ 应用范围

1. ssRNA的分子间连接；
2. ssRNA与ssDNA的分子间连接；
3. miRNA文库构建中的5'端接头的连接；
4. RNA环化；
5. 5'-RACE中将寡核苷酸连接到单链cDNA中；
6. RNA 3'末端标记；
7. tRNA修饰；
8. 在蛋白质特定位点引入非天然氨基酸。

### ■ 推荐反应条件

1. 单链RNA的环化连接

单链RNA环化连接反应参考下表反应体系，在冰上配置20 μl体系：

| 组分                                              | 使用量 (μl) |
|-------------------------------------------------|----------|
| 10x T4 RNA Ligase Reaction Buffer <sup>*a</sup> | 2        |
| PEG-8000 (50%)                                  | 8        |
| ssRNA(20 μM)                                    | 0.5      |
| RNase inhibitor(20U/μl)                         | 1        |
| T4 RNA Ligase 1 (10U/μl)                        | 1        |
| DEPC 水                                          | Up to 20 |

注意：\*a) 反应buffer含有ATP，不需要额外添加ATP

## 2. 单链RNA或DNA的分子间连接

单链RNA或DNA的分子间连接反应，在冰上制备20 μl反应体系

| 组分                                              | 使用量 (μl) |
|-------------------------------------------------|----------|
| 10x T4 RNA Ligase Reaction Buffer <sup>*a</sup> | 2        |
| PEG-8000 (50%)                                  | 8        |
| ssRNA(20 μM) <sup>*b</sup>                      | 1        |
| RNA or DNA oligo (20 μM) <sup>*c</sup>          | 2~10     |
| RNase inhibitor(20U/μl)                         | 1        |
| T4 RNA Ligase 1 (10U/μl)                        | 1        |
| DEPC 水                                          | Up to 20 |

注意：\*b) ssRNA受体需要有3' 羟基 (-OH)；\*c) RNA或DNA供体需要5' 磷酸化和3' 封闭

3. 连接反应：25℃ 2h或16℃ 16h

4. 终止反应：65℃ 15min。

## ■ 常见问题解答

1) Q1: 反应体系中PEG8000有何关键作用？

A: PEG8000是一种体积排阻剂，添加（终浓度15%~25%）PEG8000能够提高酶和底物的局部浓度，从而使底物之间的碰撞效率明显增加，因此PEG8000可有效提高连接效率。

2) Q2: 连接效率低的常见问题是什么，如何解决？

A: RNA的二级结构是导致连接效率低的主要原因之一。如果RNA的3'端或5'端被自身折叠的茎环结构遮蔽，将阻止酶接近底物。建议可在反应体系中加入终浓度为10%的DMSO，破坏RNA的二级结构，提高连接效率。

3) Q3: 产物条带下方出现明显拖尾或弥散，可能原因是什么？

A: 最有可能是存在RNase污染，导致RNA底物或产物在反应过程中被降解。务必使用无核酸酶的耗材和试剂，实验操作全程佩戴手套和口罩，反应体系中加入终浓度为1U/μl的RNase inhibitor。

4) Q4: 如何避免供体分子自身发生环化或串联现象？

A: 供体 (Donor)的3'端也就是羟基 (-OH)，它能以自身为受体发生分子内环化，或作为受体与其他工体分子连接形成串联体。建议采用3'端封闭的供体，避免发生供体分子自身发生环化或串联现象。

5) Q5: 反应体系为何不需要添加ATP？

A: 反应buffer中已经含有ATP，不需要额外添加ATP。

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。