

T4 RNA Ligase 1

REF: EG25204-S/M

储存条件

-20℃保存 2 年

产品组成

组分	规格 S	规格 M
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

产品简介

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 PPi。T4 RNA Ligase 1 对不同底物连接效率有显著区别：ssRNA-ssRNA > ssRNA-ssDNA > ssDNA-ssDNA。此外，T4 RNA Ligase 1 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。

酶活定义

一个单位定义为在 37℃ 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℃ 下，在 20 μl 反应体系中将 10 U T4 RNA Ligase 1 与 200 ng 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℃ 下，在 20 μl 反应体系中将 10 U T4 RNA Ligase 1 与 15 ng 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℃ 下，在 10 μl 反应体系中将 10 U T4 RNA Ligase 1 与 500 ng RNA 共同温育 1 h，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℃ 孵育 30 min。在连接效果不佳时可尝试 25℃ 孵育 1~2 h 或 16℃ 过夜以获得最佳连接效果。

③ 65℃ 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 8000 ^d	6~10 μl
ATP (10mM)	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）。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；

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

③ 65℃ 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	1 µg
10× T4 Rnl1 Buffer	3 µl
T4 RNA Ligase 1 (10 U/µl)	1 µl
ATP (10mM)	3 µl
[³² P] pCp	终浓度 1 µM
DMSO	终浓度 10%
Nuclease-Free Water	To 30 µl

② 16℃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: EG20002) 防止 RNA 降解；
4. 用于 RNA 3' 末端标记时需在反应体系中添加终浓度 10% 的 DMSO。