

## T4 RNA Ligase 2

REF: EG25206-S/M

### 储存条件

-20°C保存 2 年

### 产品组成

组分	规格 S	规格 M
T4 RNA Ligase 2 (10 U/μl)	100 μl	500 μl
10× T4 Rnl2 Buffer	1 ml	2×1 ml

### 产品描述

T4 RNA Ligase 2 是一种 ATP 依赖的双链 RNA 连接酶，具有 RNA 链分子间和分子内连接活性。与 T4 RNA Ligase 1 相比，该酶对双链 RNA 切刻的连接活性要明显高于对单链 RNA 的末端连接，且需要 5' 磷酸基和 3' 羟基相邻才能连接。此外，该酶还能在双链结构中，连接 RNA 的 3' 羟基和 DNA 的 5' 磷酸基。

### 活性定义

1 个活性单位 (U) 是指在 37°C 下，30 min 内连接 0.4 μg 23-mer 和 17-mer RNA 的等摩尔混合物所需的酶量。

### 失活条件

80°C，5 min。

### 质量控制

#### 蛋白纯度

经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测，蛋白检测纯度不低于 95%。

#### 内切酶活性

37°C 下，在 20 μl T4 Rnl2 Buffer 反应体系中将 10 U T4 RNA Ligase 2 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h 后，使用琼脂糖凝胶电泳检测，少于 10% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

#### DNase 活性

37°C 下，在 20 μl T4 Rnl2 Buffer 反应体系中将 10 U T4 RNA Ligase 2 与 15 ng 双链 DNA 片段共同温育 16 h 后，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 10 μl T4 Rnl2 Buffer 反应体系中将 10 U T4 RNA Ligase 2 与 500 ng RNA 共同温育 1 h 后，使用琼脂糖凝胶电泳检测，不低于 90% 的 RNA 仍保持完整。

#### 磷酸酶活性

200 μl 反应体系中加入 100 U 本酶和 2.5 mM p-Nitrophenyl Phosphate (PNPP)，37°C 孵育 4 h，碱性磷酸酶活性 <0.0001 U。

#### 宿主 DNA 残留

采用中国药典 2020 版四部通则 3407 外源性 DNA 残留量测定法第三法定量 PCR 法，本品中大肠杆菌宿主细胞 DNA 残留量 <10 拷贝 /100 U。

### 使用方法

#### 1. dsRNA 切刻的连接

① RNA 底物制备：用 65°C，3 min 预处理 RNA 底物（切刻 dsRNA），冰浴 2 min。

② 在冰上配制如下反应体系：

组分	建议加入量	终浓度
10× T4 Rnl2 Buffer	2 μl	1×
T4 RNA Ligase 2 (10 U/μl)	1 μl	0.5 U/μl
切刻 dsRNA (10 μM)	2 μl	1 μM
Nuclease-Free Water	up to 20 μl	-

③ 充分混匀并瞬离后，25°C 温育 1 h。

④ 反应结束后，向产物中加入蛋白酶 K 或 EDTA 以终止反应。

### 注意事项

1. 本品所附的 10× T4 Rnl2 Buffer 适用于连接双链 RNA 切刻。Buffer 的  $Mg^{2+}$  终浓度为 2 mM，如要连接 RNA/DNA 杂合链切刻，可适当提高  $Mg^{2+}$  浓度（不超过 10 mM），或添加 10~15% 的 PEG 8000。

2. 为防止 RNase 污染，可以添加 RNase 抑制剂，操作时需穿戴干净的手套、口罩，实验所用枪头、离心管等耗材均为 RNase-free。

3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套及口罩进行实验操作。