

T4 RNA Ligase 2, truncated KQ

GMP Grade

REF: GMP110-S/M

储运条件

-20 ± 5℃保存，有效期 24 个月。运输条件：≤ 0℃。

产品组成

组分	规格 S	规格 M
T4 RNA Ligase 2, truncated KQ GMP Grade (200 U/μl)	100 μl	500 μl
10× T4 Rnl2 KQ Buffer, GMP Grade	1 ml	2×1 ml
50% PEG 8000 (RNase-free)	1 ml	2×1 ml

产品描述

T4 RNA Ligase 2, truncated KQ GMP Grade 是 T4 RNA Ligase 2 截短型的双点突变体 (R55K, K227Q)，在保证连接效率的同时，可以大大减少对于 RNA 的非特异性连接 (RNA 的串联或自连成环)。该酶能特异性将 5' 末端预腺苷化的 DNA 或 RNA 连接到 RNA 的 3'OH 末端，非常适用于将接头连接到 Small RNA 上，用于 cDNA 文库构建。使用该酶连接时不需要 ATP，但需要 5' 端预腺苷化的接头。

本品采用符合 GMP 规范的生产与质量管理体系，保证生产过程以及原辅料全程可追溯。整个生产过程不使用抗生素和任何动物来源的原料及辅料，对宿主蛋白、外源 DNA、非特异性内切酶、DNase、RNase 等工艺相关杂质，以及微生物限度、细菌内毒素等进行严格控制。本品满足疫苗与药物生产等领域对原辅料的要求。

活性定义

200 活性单位 (U) 是指在 25℃下，1 h 内连接 80% 的 31-mer RNA 连接到预腺苷化 17-mer DNA 末端所需的酶量。

失活条件

65℃，20 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℃下，在 20 μl T4 Rnl2 KQ Buffer, GMP Grade 反应体系中将 200 U T4 RNA Ligase 2, truncated KQ GMP Grade 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℃下，在 20 μl T4 Rnl2 KQ Buffer, GMP Grade 反应体系中将 200 U T4 RNA Ligase 2, truncated KQ GMP Grade 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℃下，在 10 μl T4 Rnl2 KQ Buffer, GMP Grade 反应体系中将 200 U T4 RNA Ligase 2, truncated KQ GMP Grade 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 200 U 本酶和 2.5 mM p-Nitrophenyl Phosphate (PNPP)，37℃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 /200 U。

宿主蛋白残留

采用中国药典 2020 版四部通则 3412 大肠埃希菌菌体蛋白质残留量测定法，本品中大肠杆菌菌体蛋白质残留量低于 50 ppm。

微生物限度检测

采用中国药典 2020 版四部通则 1105 非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法，本品需氧菌总数 ≤1 cfu/ml，霉菌和酵母菌总数 ≤1 cfu/ml。

细菌内毒素残留

采用中国药典 2020 版四部通则 1143 细菌内毒素检查法第一法凝胶法，本品中细菌内毒素残留低于 0.05 EU/KU。

支原体检测

采用支原体检测试剂盒 (LAMP 法) 检测 200 U T4 RNA Ligase 2, truncated KQ GMP Grade，结果为阴性。

重金属残留

采用中国药典 2020 版四部通则 0821 重金属检查法第一法，本品重金属残留低于 10 ppm。

使用方法

① 在冰上配制如下反应体系：

组分	建议加入量	终浓度
10× T4 Rnl2 KQ Buffer, GMP Grade	2 μ l	1×
T4 RNA Ligase 2, truncated KQ GMP Grade (200 U/ μ l)	1 μ l	10 U/ μ l
50% PEG 8000 (RNase-free)	4 μ l	10%
RNA 底物 (10 μ M)	2 μ l	1 μ M
5' 端预腺苷化的接头 (20 μ M)	2 μ l	2 μ M
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l	2 U/ μ l
Nuclease-Free Water	up to 20 μ l	-

③ 充分混匀并瞬离后，25°C 温育 1~2 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. 使用本产品连接 RNA 和 5' 端预腺苷化的接头时，建议使用的 PEG 8000 的浓度为 10%~30%，有助于提高连接效率。
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。