



GSPure® T4 RNA Ligase 2

产品介绍

T4 RNA Ligase 2, 即 T4 RNA 连接酶 2, 是一种 ATP 依赖的双链 RNA 连接酶 (double-strand RNA ligase, dsRNA Ligase), 也被称为 T4 Rnl 2, 可以用于双链 RNA 进行分子内的环化连接和分子间的线性连接。T4 RNA Ligase 2 与 T4 RNA Ligase 1 (R0502) 不同的是, 对双链 RNA 中的 nick 的连接活性要大大高于对单链 RNA 末端的连接活性。

T4 RNA Ligase 2 也可用于双链核酸 (RNA 双链、RNA/DNA 杂合链或 DNA 双链) 分子内或分子间 RNA 链的 3'羟基和 DNA 链的 5'磷酸基的连接。T4 RNA Ligase 2 连接时需要 5'磷酸和 3'羟基的存在, 可以使 RNA 链或 DNA 链的 5'磷酸基和 RNA 链的 3'羟基之间发生连接反应。

应用: 主要用于连接双链 RNA 中缺刻的连接 (即双链 RNA 的粘端连接), 也可用于双链结构中, RNA 3'羟基与 DNA 5'磷酸基的缺刻连接。

来源: 大肠杆菌表达的重组蛋白, 表达基因的来源为 T4 噬菌体。

产品规格

货号	试剂	规格	保存条件
R0503	GSPure® T4 RNA Ligase 2	1000 U	-25 ~ -18°C

产品组分

组分	1000 U	储存条件
T4 RNA Ligase 2(10 U/μL)	100 μL	-25 ~ -18°C保存
10× Reaction Buffer	300 μL	
RNase-Free ddH ₂ O	1 mL	

Storage Buffer: 10 mM Tris-HCl(pH7.5), 50 mM KCl, 35 mM(NH₄)₂SO₄, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 50 %(v/v)Glycerol.

10× Reaction Buffer: 500 mM Tris-HCl(pH7.5), 20 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 4 mM ATP.

失活或抑制: 85 °C 加热 5 min 可使 T4 RNA Ligase 2 失活, 也可加入蛋白酶 K 或 EDTA 抑制其活性。

质量控制

- 1、无 RNase、DNase 污染;
- 2、经考马斯亮蓝染色的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶染色判断, T4 RNA 连接酶 2 纯度>90%。

活性单位定义

一个单位的定义是在 37 °C 下, 在 20 μL 的体系中, 30 分钟内连接 0.4 μg 23-mer 和 17-mer RNAs 的等摩尔混合物所需的酶量。



反应体系及条件

1. 双链 RNA 或 DNA/RNA 杂合双链的底物制备:

将 RNA 混合物或 DNA 和 RNA 的混合物（按摩尔质量比 1:1 混合），推荐的终浓度为 20 μM （10 ~ 50 μM 均可），65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3min，然后冰上孵育 2 min。

2. 双链结构中 RNA3' 羟基和 DNA5' 磷酸基连接的反应体系（于冰盒上配制）:

组分	添加量	反应终浓度
RNase-Free ddH ₂ O	Up to 20 μL	-
Nicked DNA/RNA Substrate	X μL	1 μM
10 \times Reaction Buffer	2 μL	1 \times
50 % PEG8000	4 μL	10 %
MgCl ₂ (100 mM)	1.6 μL	8 mM
T4 RNA Ligase 2 (10 U/ μL)	1 μL	0.5 U/ μL
Total	20 μL	-

3. 对于双链 RNA 缺刻的连接，使用 T4 RNA Ligase 2 连接的反应体系（于冰盒上配制）:

组分	添加量	反应终浓度
RNase-Free ddH ₂ O	Up to 20 μL	-
Nicked dsRNA Substrate	X μL	0.5 μM
10 \times Reaction Buffer	2 μL	1 \times
T4 RNA Ligase 2 (10 U/ μL)	1 μL	0.5 U/ μL
Total	20 μL	-

反应条件

连接反应: 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。如果发现效果欠佳可以尝试 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。为了使连接反应更加充分，可以适当延长连接反应时间。

终止反应*: 反应结束后加入蛋白酶 K 或 EDTA，即可终止反应。

*由于 T4 RNA Ligase 2 热失活需要 85 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min，这样可能导致 dsRNA 或 DNA/RNA 杂合双链变性，因此通常不建议通过加热方式失活 T4 RNA Ligase 2。如果后续无需保持双链状态，则推荐 85 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 以失活 T4 RNA Ligase 2。

注意事项

1、由于涉及 RNA 操作，需要严格按照 RNA 操作的规范进行，避免 RNase 污染，相关试剂和耗材需要经过 DEPC 处理去除 RNase 或者确保是 RNase free 的。本反应体系中涉及双链 RNA，双链 RNA 可以耐受 RNase A 和 RNase T1 等。如果涉及单链 RNA，包括 dsRNA 制备后存在部分 RNA 序列是单链的情况，可以考虑适量添加 RNase Inhibitor;

2、如果同时进行多个连接反应，可以把上表中除 Nicked dsRNA Substrate 之外的所有溶液和酶提前预混合，然后再分装到各反应管内。可根据具体应用选择合适的操作方法，可能需要准备额外的试剂，如 RNase inhibitor、DEPC 水等;

3、反应体系中的 Nicked dsRNA Substrate 的最终浓度可以达到 1 μM ，在该反应体系中可以确保充分连接。实际使用过程中，例如由于底物量有限等原因，可以适当减少 Nicked dsRNA Substrate 的用量，例如使最终浓度为 0.5 μM 或 0.2 μM 等;

4、本产品仅限于专业人员科学研究用，为了您的安全健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。