

热稳定腺苷化 DNA/RNA 连接酶说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

描述：

5' AppDNA/RNA 热稳定连接酶来自嗜热碱甲烷杆菌 (Methanobacterium thermoautotrophicum)，是 RNA 连接酶催化亚基的赖氨酸点突变体。该酶催化的连接不依赖于 ATP，但需要 5' 预腺苷化的接头才能将其连接到 RNA 或单链 DNA 的 3' OH 末端。该酶也可催化 3' 端被 2' -O-甲基化的 RNA 和 5' 预腺苷化接头的连接反应。连接反应的最适反应温度为 60-65℃。即使在 ATP 存在的条件下，该连接酶也不能使 RNA 或单链 DNA 的 5' 端磷酸发生腺苷化，因此降低非特异性的串联和环化。该酶为热稳定型，最佳反应温度为 65℃，此温度下降低了 RNA 的二级结构，大大提高连接效率。

组分

名称	10T
Thermostable 5'AppDNA/RNA Ligase (20 pmol/μl)	20 μl
10×AppDNA/RNA Ligase Buffer	100 μl
50 mM MnCl ₂	100 μl

应用：

二代测序文库构建中连接单链 DNA 和腺苷化的 DNA 接头。构建小 RNA 二代测序文库，可在较高温度下连接预腺苷化的接头和 RNA。

储存： -20℃可保存 3 年。

使用注意事项

- (1) 1×AppDNA/RNA Ligase Buffer: 10 mM Bis-Tris-Propane-HCl pH 7.0, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT。
- (2) 该酶只能连接 5' 一端预腺苷化的 Oligo 接头到单链 DNA 或 RNA 的 3' -OH 基团。
- (3) 当腺苷化底物的 5' 一端第一个碱基为“C”时，连接效率较差。

使用方法：

1. 配置如下反应体系

<u>ssDNA/RNA Substrate</u>	<u>20 pmol</u>
<u>5' App DNA Oligonucleotide</u>	<u>40 pmol</u>
<u>10×AppDNA/RNA Ligase Buffer</u>	<u>2 μl</u>
<u>50 mM MnCl₂ (for ssDNA ligation only)</u>	<u>2 μl</u>
<u>Thermostable 5'AppDNA/RNA Ligase</u>	<u>2 μl</u>
<u>ddH₂O</u>	<u>Up to 20 ul</u>

2. 65° C 孵育 1h。
3. 95° C 3min, 终止反应。