

产品说明

T4 RNA 连接酶 2，截短型 KQ (T4 Rnl2tr KQ) 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。反应无需 ATP，但需预腺苷化接头。

T4 Rnl2tr KQ 是 T4 RNA 连接酶 2，截短型的双点突变体。K227 的突变降低了赖氨酰腺苷化。由于降低了 T4 Rnl2tr 从接头将腺苷基团转移到 RNA 5'磷酸基的活性，K227Q 可以减少 T4 Rnl2tr 非特异性的连接（串联体和环）。在 T4 Rnl2tr K227Q 中进一步突变 R55K，提高了酶的连接活性，使其与野生型 T4 Rnl2tr 连接活性水平一致。

因为不再使用 ATP，而改用预腺苷化接头，同时降低赖氨酰腺苷化酶的活性，所以连接反应的背景可以降至最低。该酶已用于二代测序 Small RNA 的文库构建中，优化了接头的连接过程。本公司 T4 RNA 连接酶 2，截短型 KQ 是重组表达，并经多步纯化制备的重组蛋白。

活性定义

200 活性单位指在 25°C, 1×T4 RNA 连接酶反应缓冲体系(20ul), 60 min 内将 80%的 31-mer RNA (5'-FAM-rArGrUrCrGrUrArGrCrCrUrUrArUrCrCrGrArGrArUrUrCrArGrCrArArUrA-3') 连接到预腺苷化的 miRNA 通用克隆接头 17-mer DNA(5'-rAppCTGTAGGCACCATCAAT-NH2-3', 14μM) 末端所需的酶量。

活性测定条件

1× T4 RNA 连接酶 2 反应缓冲液：50 mM Tris-HCl (pH7.5 @ 25°C), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10% (w/v) PEG 8000, 20 pmol of 5'-FAM-RNA, 40 pmol 预腺苷化 DNA, 25°C温育 60min。

浓度：200U/μl

保存条件：-20°C可保存 2 年，避免反复冻融

特点与适用范围

- 将预腺苷化的 DNA 或 RNA 序列标签连接到任何 RNA 3'末端
- 将单链腺苷化引物连接至小 RNA 上，用于 cDNA 文库构建
- 将单链腺苷化引物连接至 RNA 上，用于链特异 cDNA 文库构建

产品包装规格及组成

Component	AE1355A	AE1355B
T4 RNA 连接酶 2，截短型 KQ	2000U	10kU
10× T4 RNA 连接酶 2 Buffer	0.2ml	1.0ml
50% PEG8000	0.2ml	1.0ml

质量控制

相关测试表明无外源单链和双链 DNA 核酸内切酶、外切酶、RNase 以及磷酸酶的污染。PCR 方法检测无宿主残余 DNA。

酶贮存缓冲液

10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, pH 7.5 @ 25°C

注意事项

- 热失活：65°C温育 20 分钟。
- 可加入核酸酶抑制剂防止 RNA 污染。

使用实例：3' OH of RNA 和 5'预腺苷化 DNA linker 连接反应

1) 按下表配制反应体系

反应组分	体积或浓度
10×T4 RNA 连接酶 2 Buffer	2ul
RNA 底物 (10μM)	2ul
5'预腺苷化 DNA linker (20μM)	2ul
50% PEG8000*	4ul
酶(200 U/μl)	1-2ul
无核酸酶 H ₂ O	Yul
总体积	20ul

2) 25℃×1-2h 反应，

3) 添加蛋白酶 K 或终浓度 20mM EDTA 失活酶，

4) 尿素变性 PAGE 电泳检测酶切产物，或按实验目的进行后续操作。

* 为了提高连接效率，PEG8000 浓度可以高达 25%

警告：本产品仅限科研实验使用，临床应用安全性和有效性未鉴定，不可用于医疗临床诊断。