

5' DNA 腺苷化试剂盒

目录号: AE1356

使用前请仔细阅读说明书

(Mth RNA ligase)

产品说明

5' DNA 腺苷化试剂盒能将 5'-磷酸化的 DNA 寡核苷酸 5'端腺苷化。试剂盒操作简便，反应组分包括 Mth RNA ligase、ATP 和 10 反应 buffer，可以高效的将 5'-磷酸化的单链 DNA 腺苷化，生成 5'-腺苷化 DNA(AppDNA)。该试剂盒通常能将 95%的 5'-磷酸化 DNA 转化成腺苷化 DNA，高效的转化不仅增加产量，还能避免胶回收提纯步骤。使用该试剂盒对 5'-磷酸化 ssDNA 进行腺苷化处理时，不需要对 3'端进行保护。

本试剂盒中的 Mth RNA ligase 是重组表达，并经多步纯化制备的重组蛋白，分子量 45.3kDa。

活性测定条件

在 1X 5' DNA Adenylation Buffer (50 mM sodium acetate, pH 6.0, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.1 mM EDTA)，100 μM ATP 下, 65 度温育 1 小时。

浓度: 50pmol/μl (2.265mg/ml)

保存条件: -20℃可保存 2 年，避免反复冻融

特点与适用范围

- 单步反应，即可腺苷化
- 最简便的腺苷化方法
- 腺苷化产物无需纯化
- 65 度反应消除了底物二级结构的抑制作用
- 对 ssDNA 连接头腺苷化后，用于与 3'-OH RNA 连接建库进行二代测序
- 反应体系易于放大，放大 6 倍对效率没有影响，甚至可以放大到 umole 级别

产品包装规格及组成

Component	AE1356A	AE1356B
Mth RNA ligase	10 次 (20ul)	50 次 (100ul)
10×5'AppDNA/RNA Buffer	0.2ml	1.0ml
1mM ATP	0.2ml	1.0ml

质量控制

经过严格的质控检测，无单链和双链 DNA 核酸内切酶、核酸外切酶、RNase、磷酸化酶、内源 DNA 污染。

酶贮存缓冲液

20 mM Tris-HCl (pH7.5), 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glycerol。

注意事项

- 该酶转化率低，需要约等摩尔浓度的酶和底物 DNA 进行反应。
- 在二代测序 cDNA 文库构建实验中，预腺苷化 DNA 的连接头可用于 RNA 3' 末端的连接。
- 若需要回收腺苷化的单链核酸并去除蛋白和 ATP，可以采用酚氯仿抽提、柱纯化等
- ssDNA 的 3'-端可以采用磷酸化、NH₂ 等修饰，从而减少 ssDNA 环化产物。
- 对于 3'-端没有保护的 ssDNA 底物，建议把 ATP 浓度提高到 0.5mM，从而抑制 ssDNA 环化与寡聚化

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。

应用举例：

1、ssDNA 的 5'腺苷化

1) 按如下方案配制反应混合液：

Components	Volume
5'-Phosphorylated DNA Oligonucleotide	100 pmol (5 pmol/ μ l)
10 $\times$ 5'AppDNA/RNA Buffer	2 μ l
1 mM ATP	2 μ l
Mth RNA Ligase(50 μ M)	2 μ l (100 pmol)
Nuclease-free Water	to 20 μ l

2) 65°C 温育 2 小时

3) 85 度加热 5 分钟，失活酶

备注：大量制备 5'腺苷化 ssDNA 时，可以按如下方案操作（20-50ul）：30 μ M ssDNA，30 μ M Mth RNA Ligase，65°C 反应 2 h。1 μ l 蛋白酶 K $\times$ 37°C $\times$ 15min 失活连接酶，酚氯仿异戊醇(25:24:1)、氯仿异戊醇(49:1)抽提，乙醇沉淀 5'腺苷化 ssDNA。

2、ssDNA 的 5'腺苷化与 3'-OH RNA 样本连接

1) 按如下方案配制反应混合液：

Components	Volume
10XAM Buffer A	2 μ l
50% PEG 8000	8 μ l
5'-OH/3'-OH RNA Substrate (10 μ M)	1 μ l
5'-P-DNA linker (20 μ M)	2 μ l
ATP (1 mM)	2 μ l
Thermostable 5'App DNA/RNA Ligase (20 μ M)	1 μ l
Mth RNA Ligase (50 μ M)	0.5 μ l
Nuclease-free H ₂ O	to 20 μ l

2) 65°C 温育 2 小时

3) 加入 1 μ l Proteinase K, 37°C 温育 15min，或加入终浓度 10mM EDTA 终止反应。

Proteinase K 有助于释放被连接酶结合的 RNA。

注: 本公司有售 Thermostable 5' App DNA/RNA Ligase（AE1357）。