

产品说明

ssDNA/RNA 环化连接酶为热稳定的 DNA/RNA 连接酶，不依赖于 ATP，可催化单链 DNA 或单链 RNA 的环化，也可催化其分子间连接，但其对单链 DNA 的连接效率更高。环化反应中，要求催化底物单链 DNA/RNA 具有 5'-磷酸基团和 3'-OH 基团。对于大于 15nt 的单链底物，该酶都能高效的连接。该酶还可催化 DNA 或 RNA 分子与预腺苷化的 DNA 接头之间的连接，另外，在 ATP 过量的情况下，该酶可使 DNA/RNA 分子腺苷化。

本公司 ssDNA/RNA 环化连接酶是重组表达，并经多步纯化制备的重组蛋白。

活性定义

1 个活性单位为 60°C 下 1 小时内催化 1pmol 5'-磷酸化 Oligo (55mer)完全环化所需的酶量。

活性测定条件

30mM Tris-acetate (pH 7.5), 60mM potassium acetate, 1mM DTT, 65°C温育。

浓度: 100U/ul

保存条件: -20°C可保存 2 年，避免反复冻融

特点与应用

产品包装规格及组成

Component	AE1358A	AE1358B
ssDNA/RNA 环化连接酶	2kU	10kU
10×环化酶 Buffer	0.2ml	1.0ml
50 mM MnCl ₂	0.2ml	1.0ml

质量控制

经过严格的质控检测，无单链 DNA 核酸外切酶、核酸内切酶、RNase 和磷酸酶污染。

酶贮存缓冲液

20 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM KCl, 1 mM DTT and 0.1 mM EDTA, 50% glycerol.

注意事项

- 添加终浓度 20-50μM 的 ATP 可提高环化效率（ATP 终浓度高于 20μM 以上时会极大抑制环化效率，甚至导致环化失败），高于 1mM ATP 浓度会抑制连接反应。
- 对于单链 DNA 产物的连接，需要加入终浓度 2.5mM MnCl₂。
- 5'端未磷酸化的底物不能用于连接，3'端无-OH 的底物不能用于连接。即环化底物 ssDNA 或 RNA 必须带有 5'磷酸基团，3'端含有 OH。
- 对于含有二级或复杂结构的连接底物，可加入 0.4~0.8 M Betain 以提高连接效率。不过本公司结果表明 Betain 没有提升连接效率。
- 该酶对底物碱基具有选择性，5'末端连接效率: G > A >>> T (U)>>> C, 3'末端连接效率 T(U) > A > G, 当 3'端的碱基为 C 时不能用于连接，几乎无连接产物。
- 本酶对 ssDNA 和 RNA 的环化效率极高，多数情况下，90%以上的底物被环化。未被环化的 ssDNA 可通过加入 5U 本公司 Exonuclease I (AE2202)，37°C 消化 15min 去除，以获得高纯度的环化 ssDNA。未环化的 ssRNA，可利用本公司的 RNase R 去除。
- 对于连接底物量较少的实验来讲，推荐缩小体系，而不是减少酶的用量。在小体系实验时注意体系的蒸发，可加入矿物油以防止蒸发。

使用实例：

1) 按下表配制反应体系

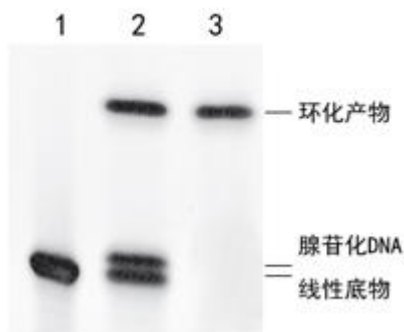
反应组分	体积或浓度
10×CircLigase Buffer	2ul
50 mM MnCl ₂	1ul
5'磷酸化 ssDNA/RNA	10-100 pmol
CircLigase (100 U/μl)	1-2ul
H ₂ O	Xul
总体积	20ul

2) 65°C×60min 反应，

3) 加入 1 μl Proteinase K, 37°C 温育 15min, 或 85°C 加热 10min 失活酶, 或加入 10mM EDTA 终止反应。Proteinase K 有助于释放被连接酶结合的 RNA。

4) 尿素变性 PAGE 电泳检测连接产物，或按实验目的进行后续操作。

经典环化结果（50nt ssDNA）如下



泳道1为未加环化酶，2为加入环化酶，3为环化产物加入ExoI酶消化产物。

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。