

产品说明

SplintR 连接酶也称为 PBCV-1 DNA 连接酶或 Chorella 病毒 DNA 连接酶，在 ATP 作为辅助因子条件下，在模板 RNA 链存在下，高效连接与 RNA 链互补的相邻的 DNA 的 5'磷酸末端和 3'羟基末端。被连接的可以是两条 DNA 单链；也可以是一条 DNA 的 5'端与 3'端与 RNA 模板以环状形式配对，连接成一个环状的 DNA 单链。因此非常适合基于锁式探针(Padlock probe)或上下游双探针的 microRNA 检测。锁式探针是一种较长的单链 DNA 寡核苷酸片段，两个末端和靶标序列毗邻互补，探针中间的一段序列不与靶标序列配对，可以作为通用引物的结合位点。本酶对于平末端、粘性末端的连接、以及双链 DNA、双链 RNA、DNA/RNA 杂交双链中的单链切口都可以连接。SplintR 连接酶的这种活性可以用于 miRNAs 等微小 RNA 和 mRNA 的检测与单核苷酸多态性 SNP 分析。在二代测序和分子诊断等众多领域中，SplintR 是富集目的基因的理想选择。SplintR 连接酶是 RNA 检测的最佳用酶，其对 RNA 介导固定的 DNA 底物亲和性强（米氏常数 $K_m = 1 \text{ nM}$ ），能够在复杂的混合物中检测到亚纳摩尔级的特定 RNA。

SplintR 连接酶在广泛条件下，例如 $10 \mu\text{M} - 1 \text{ mM}$ ATP, pH 6.5–9.0, 均有活性。其中最优反应条件为高于 5 mM Mg^{2+} , pH 7.5 - 8.0。37°C 反应，补充 5 mM Mn^{2+} 可以提高反应活性。高于 100 mM 一价阳离子抑制酶活性。相比 dA/U 碱基对, 5'端 dC/G 与 dG/C 碱基对对连接反应具有部分抑制作用，特别是相邻的碱基对也是 C/G 的情况。

本公司 SplintR Ligase 是重组表达，并经多步纯化制备的重组酶。

活性定义

1 单位指在温度为 25°C， $1 \times$ SplintR Ligase 反应缓冲体系的条件下，15min 内连接 50% 的 2pmol DNA 链（与 RNA 杂交配对形成的带缺口的 DNA/RNA 底物）所需的酶量。

活性测定条件

50 mM Tris-HCl， 1 mM ATP， 10 mM MgCl_2 ， 10 mM DTT(pH 7.5 @ 25°C)，25°C 温育。

浓度：25U/ μl

保存条件：-20°C 保存

特点与适用范围

- 基于 DNA 探针连接进行 RNA 检测
- SNP 或剪接变异检测
- 基于锁式探针(Padlock probe)的 microRNA 检测
- 互补 RNA 序列配对的单链 DNA 连接反应
- RASL-seq (RNA-mediated oligonucleotide annealing, selection, and ligation with next-generation sequencing)
- 热失活：65°C 加热 20min。

产品包装规格及组成

Component	AE1359A	AE1359B
SplintR Ligase	2000U	10kU
$10 \times$ SplintR Ligase Buffer	0.3ml	1.5ml

质量控制

相关测试表明无外源内切、外切脱氧核糖核酸酶、RNase 污染。PCR 方法检测无宿主残余 DNA。

酶贮存缓冲液

10 mM Tris-HCl， 300 mM NaCl， 1 mM DTT， 0.1 mM EDTA，50% Glycerol，pH 7.4 @ 25°C。

注意事项

- 本产品需要辅助因子 ATP 参与反应
- 本酶活性受单价阳离子抑制，因本酶保存在含 300mM NaCl 的储存液中，建议使用时酶的加入量不要超过反应体积的 5%；或将酶稀释 5-10 倍使反应体系中常见一价阳离子(NaCl、KCl)浓度降低至 50 mm 以下。
- 反应温度设定在 16–37°C，初次尝试建议 25°C
- SplintR Ligase 浓度为 10.5 μ M，建议反应体系连接酶浓度为 100 nM - 1 μ M，或者为底物可连接末端的 2 倍。 若需要稀释酶，建议使用本公司稀释缓冲液 A（DB001）。
- 若来连接效率不理想，建议延长连接反应时间，尽量避免增加酶浓度超过 1 μ M.
- 如果某一特定底物（例如缺口附近具有多个连续 G:C 碱基对）的连接效率低，可以降低 ATP 浓度，通常会显著提高连接效率。推荐本公司 Buffer 为：1 $\times$ T4 RNA Ligase Reaction Buffer (目录号 AE1351)，添加终浓度 10 μ M 的 ATP。
- RNA 模板与待连接的 DNA 探针之间的配对碱基数总数不低于 20bp，可以满足正常的连接反应。缺口两侧的配对区不一定要要求相等，单侧配对区最低为 4-6 个碱基对也可以发生有效连接，但与具体碱基序列有一定相关性。
- 添加 SSB 蛋白（例如本公司 SSB 蛋白，目录号 AE1902, AE1903, AE1904, AE1905, AE1906）可以提高连接效率，并降低非模板指导的 DNA 探针与 RNA 的连接。
- 提高连接反应温度可以提高连接忠实性

相关产品

AE1351: T4 RNA Ligase

应用实例

1. RNA 模板指导的 DNA 连接反应

建议反应体系中底物浓度在 50 nM~2 μ M 之间，体系中酶的浓度低于 1 μ M（本 SplintR 酶约为 10 μ M）。在连接反应中，酶的浓度可设为底物浓度的 2~3 倍。

1) 将等摩尔浓度的 RNA 模板和互补配对的 5'磷酸化 DNA 混合均匀，75°C 2min 后缓慢降温至室温。

2) 按下表配制反应体系

反应组分	体积/ μ l
10 $\times$ Buffer	2
退火后 RNA/DNA 底物	100ng-1 μ g
SplintR Ligase (25U/ μ l)	1
H ₂ O	Variable
总体积	20

3) 25°C 连接 15-60min;

4) 65°C 加热 20min，使酶失活；

5) 根据实验目的，进行 PAGE 电泳检测连接产物，或进行 phi29 DNA 聚合酶催化的滚环复制。

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。