

Specification Sheet

Product Name:	PBCV-1 DNA Ligase
SKU #:	P748845
Version:	1
Source:	<p>Recombinant阿拉丁生产的 PBCV-1 DNA Ligase 是一种 ATP 依赖的 DNA 连接酶，能够高效催化与一条互补的 RNA 单链配对的两条相邻 DNA 单链的连接反应。这两条相邻的 DNA 链中，提供 3' 羟基的被称之为受体 DNA 链 (Acceptor DNA)，提供 5' 磷酸的被称之为供体 DNA 链 (Donor DNA)；在这个连接过程中需要一条互补的 RNA 链对两条 DNA 单链起“夹板”或“支架”的作用。PBCV-1 DNA Ligase 在连接点处可以耐受多种碱基对的组合，但当 5' 端磷酸化的 Donor DNA 与“夹板”RNA 所形成的第一个碱基对是 dC/G 和 dG/C 时会产生部分抑制，当 Donor DNA 与“夹板”RNA 所形成的第 1 和第 2 个碱基对都是 dC/G 或 dG/C 碱基对时，酶活性会被更进一步抑制。5' 磷酸化的 Donor DNA 的第一个碱基为 dA 或 dT 时连接效率较高；3' 端羟基化的 Acceptor DNA 的第一个碱基为 dT 时连接效率较高。该酶对于通过 RNA “夹板”介导的 DNA 连接具有比 T4 DNA Ligase 更强的亲和力 (Km≈1nM)，和随后的 PCR、qPCR 或滚环扩增 (rolling circle amplification) 等技术相结合，能够在复杂的混合物中超高灵敏度检测到低于纳摩尔级的特定目标 RNA。PBCV-1 DNA Ligase 的这种活性使得该酶可以用于包括各种 SNP 的 miRNA、mRNA 和非编码 RNA 的定性或定量检测，以及用于二代测序 (next-generation sequencing) 和分子诊断 (molecular diagnostics)。PBCV-1 DNA Ligase 对 ATP 的浓度要求比较宽泛，ATP 浓度为 10μM-1mM 时都可以有效发挥作用；对 pH 的耐受也比较高，在 pH6.5-pH8.9 的范围内都能很好地发挥作用。通常，当 Mg²⁺ 的浓度大于 5mM、pH 在 7.5-8.0 之间时，PBCV-1 DNA Ligase 具有较高的活性。该酶的活性可以通过提高反应温度至 37°C，补充 5mM Mn²⁺ 而得以增强；但当反应体系中的盐离子浓度超过 100mM 时，该酶活性即被抑制。来源 (Source) 大肠杆菌重组表达外观 (Appearance) 无菌液体 保存液 (Storage Buffer) 10mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerol, pH 7.4, 25°C. 酶浓度 (Enzyme Concentration) 25 U/μl 纯度 (Purity) 不含 DNA 内切酶和外切酶，不含 RNA 酶，不含磷酸酯酶。活性定义 (Activity Definition) One unit is defined as the amount</p>

of enzyme needed to ligate (to 50% completion) 2 picomoles of a tripartite FAM-labeled DNA:RNA hybrid substrate in a 20 μ l reaction at 25°C in 15 minutes in 1 \times Ligation Buffer. 组分表 P748845 Component 1250U 5KU Storage P748845A PBCV-1 DNA Ligase (25U/ μ l) 50 μ l 200 μ l -20°C. Avoid freeze/ Thaw cycle. P748845B 10 \times Reaction Buffer 150 μ l 600 μ l -20°C. Avoid freeze/ Thaw cycle. 产品应用 基于探针法的 microRNA 等小 RNA 的检测：通过互补 RNA 序列进行“夹板”固定的单链 DNA 的连接；使用 DNA 探针进行连接达到检测特定 RNA 的目的；SNP 或可变剪接的检测；RASL-seq 分析。产品优势 PBCV-1 DNA Ligase 在连接点处可以耐受多种碱基对的组合，但当 5' 端磷酸化的 Donor DNA 与“夹板”RNA 所形成的第一个碱基对是 dC/G 和 dG/C 时会产生部分抑制。使用说明 1. 杂合 DNA/RNA 双链底物的制备：将两条单链 DNA 和一条与它们互补的单链 RNA 等摩尔数混合，推荐的终浓度为 20 μ M，在 10–50 μ M 范围内均可，90°C 孵育 1 min，然后通过梯度降温至 25°C 退火形成 DNA/RNA 杂合双链。推荐使用生产的 Annealing Buffer for RNA oligos (5 \times)，并按照该产品使用说明进行退火反应，退火后的双链如果不立即使用，推荐在 -80°C 保存。2. 对于 DNA/RNA 杂合链中两条 DNA 链 nick 的连接，参考下表在冰浴中配制如下反应体系：Reagent Volume Final Concentration DEPC-treated Water 15 μ l - 10 \times Reaction buffer 2 μ l 1 \times Nicked DNA/RNA Substrate (1 μ M) 2 μ l 0.1 μ M PBCV-1 DNA Ligase (25 U/ μ l) 1 μ l 1.25 U/ μ l Total Volume 20 μ l - 注：由于涉及 RNA 操作，需要严格按照 RNA 的操作规范进行，避免 RNase 污染，相关试剂和耗材需要确保是 RNase-free 的，或者是经过 DEPC 处理以去除 RNase 的。3. 连接：25°C 孵育 15–60 min。4. 终止：65°C 孵育 20 min；或加 EDTA 以灭活。5. 保存：将反应后的样品放置于冰上以待短时间内使用或直接冻存于 -20°C。注意事项：1. PBCV-1 DNA Ligase 被一价阳离子所抑制，建议一些常见的盐如 NaCl、KCl 等在反应中应保持 50 mM 以下。为了保持该酶的贮存稳定性，酶被提供在含有 300 mM NaCl 的贮存缓冲液中。该酶被加入反应系统时，至少应该进行 6 倍的稀释，通常宜进行大于 10 倍的稀释。2. PBCV-1 DNA Ligase 的反应温度建议在 16–37°C 之间进行初次实验，建议反应温度可设为 25°C。该酶的连接反应时间通常可以在 10–60 min 之间，对于很多实验来说，推荐的连接反应时间为 15 min。3. 在反应体系中 PBCV-1 DNA Ligase 的最终浓度建议在 100 nM–1 μ M 之间。生产的 PBCV-1 DNA Ligase 的浓度约为 13 μ M。建议在连接反应中将酶的浓度至少设为底物浓度的

ALADDIN SCIENTIFIC CORPORATION

14078 Meridian Parkway, Riverside, CA. 92518

2~3 倍。4. 如果反应不能像预期的那样有效进行，建议延长孵育时间而不是将反应中酶的浓度增加至超过 1 μ M。5. 对于在标准 PBCV-1 DNA Ligase 反应缓冲液中连接效率低的底物，例如连接点处具有 G:C 碱基对的底物，建议将 ATP 的浓度调整到 10 μ M 以提高连接效率。6. 提高反应温度可以提高 PBCV-1 DNA Ligase 的活性和连接专一性；37°C 反应可提高 microRNA 等小 RNA 的检测效果。7. PBCV-1 DNA Ligase 连接效率会随着“夹板”RNA 长度的减少（50 bp-20 bp）而逐渐降低，当 RNA “夹板”长度小于等于 10 nt 时，连接效率基本为零。8. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。9. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

Specifications & Purity:

Concentration:

Formulation:

Reconstitution:

Storage Conditions:

ActiBioPure™, Bioactive, High performance, EnzymoPure™, Recombinant, 25 U/ μ l
25 U/ μ l
Liquid

Store at -20°C, Avoid repeated freezing and thawing

Parameter	Limit Values
Appearance(P748845)	Liquid
Enzyme activity: 25U/ μ l	Conform
Endonuclease Activity (Nicking)	Conform
Exonuclease Activity (Radioactivity Release)	Conform
Purity(SDS-PAGE) \geq 95%	Conform
RNase Activity (Extended Digestion)	Conform
Seal Integrity Testing	Conform