

RtcB Ligase

产品编号	产品名称	包装
R0616S	RtcB Ligase	25次
R0616M	RtcB Ligase	100次
R0616L	RtcB Ligase	500次

产品简介:

- 碧云天生产的RtcB Ligase, 即RtcB连接酶, 是一种可催化单链RNA分子3'末端的3'-磷酸或2', 3'-环磷酸与单链RNA分子5'末端的5'-羟基连接的酶。本产品与RtcB Ligase (High Concentration) (R0617)相比, 仅酶浓度不同, 其余特性相同。如果希望获得更高的连接效率, 推荐尝试RtcB Ligase (High Concentration)。
- RtcB Ligase主要用于单链RNA分子之间的连接或单链RNA的环化, 连接时需要3'-磷酸或2', 3'-环磷酸基团和5'-羟基的存在。
- RtcB Ligase也可以用于DNA (Donor)和DNA (Acceptor)、RNA (Donor)和DNA (Acceptor)之间的连接, 但连接效率非常低。
- RtcB Ligase主要用于3'-磷酸或2', 3'-环磷酸末端的单链RNA/DNA分子与5'-羟基末端的单链RNA分子之间的连接; 对于单链RNA、单链DNA或单核苷酸分子间或分子内5'-P末端与3'-OH末端之间的连接, 推荐使用碧云天生产的T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase) (R0621)或T4 RNA Ligase (D7021); 对于双链RNA的连接, 推荐使用碧云天生产的T4 RNA Ligase 2 (dsRNA Ligase) (R0632); 对于5'端预腺苷酰化的DNA或RNA (App-DNA或App-RNA)与3'端羟基的RNA的连接, 推荐使用碧云天生产的T4 RNA Ligase 2, truncated (R0635)或T4 RNA Ligase 2, truncated KQ (R0637)。
- RtcB Ligase的催化连接反应需GTP、MnCl₂的参与, 并在反应过程中生成GMP, 用于底物3'-磷酸末端的活化和连接; 对于末端是2', 3'-环磷酸的底物, 须先将末端水解为3'-磷酸基团, 再由GMP进行活化连接[1, 2]。
- 碧云天RtcB Ligase催化连接ssRNA的效果请参考图1。

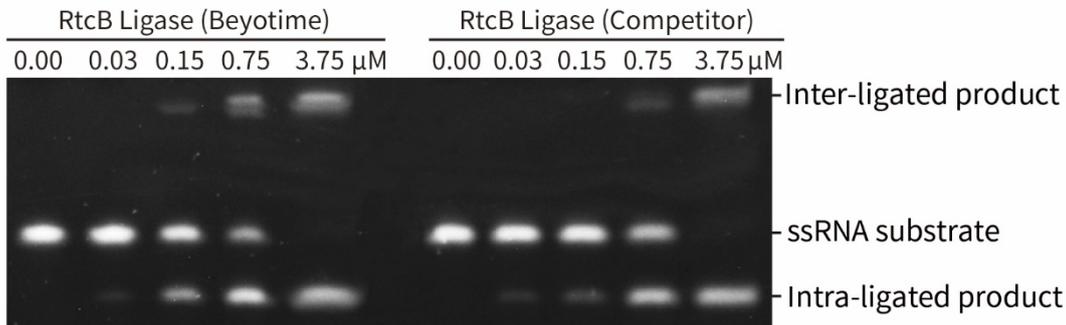


图1. 碧云天RtcB Ligase (R0616)催化连接ssRNA的效果图。在20μl反应体系(50mM Tris-HCl, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT (pH 8.3 @ 25°C))中加入10pmol长度为20nt的ssRNA (5'-OH-UGGCUCCGAUAUCACGCUUCp-3'), 适量BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876), 以及最终浓度为图中所示的本产品或N公司(Competitor)的RtcB Ligase, 37°C孵育1小时进行反应。取反应后产物5μl, 加入5μl DNA/RNA Loading Buffer (2X, for Denaturing PAGE) (R0212), 进行15%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(180V电泳60分钟), 随后使用NA-Red (EB升级换代产品, 2000X) (D0128/D0130)室温染色5分钟, 在紫外灯下观察实验结果。如图所示, 本产品与N公司的RtcB Ligase产品相比, 具有类似的连接ssRNA的效果。Inter-ligated product为分之间连接的产物, Intra-ligated product为分子内连接形成的环形小RNA。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **用途:** 用于末端为3'-磷酸或2', 3'-环磷酸的ssRNA或ssDNA分子与末端为5'-羟基的ssRNA的连接; ssRNA的环化; 使用标记探针检测末端为3'-磷酸、2', 3'-环磷酸或5'-羟基的RNA。
- **来源:** 纯化自携带编码大肠杆菌RtcB Ligase基因的*E. coli*重组菌株。
- **纯度:** 不含DNA内切酶和外切酶, 不含RNA酶, 不含磷酸酯酶。
- **酶储存溶液:** 10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 50% Glycerol (pH 7.4 @ 25°C)。
- **10X Reaction Buffer:** 500mM Tris-HCl, 30mM MgCl₂, 750mM KCl, 100mM DTT (pH 8.3 @ 25°C)。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R0616S-1	RtcB Ligase (15μM)	25μl
R0616S-2	10X Reaction Buffer	60μl

R0616S-3	GTP (1mM)	60μl
R0616S-4	MnCl ₂ (10mM)	60μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R0616M-1	RtcB Ligase (15μM)	100μl
R0616M-2	10X Reaction Buffer	250μl
R0616M-3	GTP (1mM)	250μl
R0616M-4	MnCl ₂ (10mM)	250μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R0616L-1	RtcB Ligase (15μM)	500μl
R0616L-2	10X Reaction Buffer	1.2ml
R0616L-3	GTP (1mM)	1.2ml
R0616L-4	MnCl ₂ (10mM)	1.2ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，至少一年有效。

注意事项：

- 本产品提供的试剂均用不含DNA酶和RNA酶的水配制，可直接用于3'端为磷酸或2', 3'-环磷酸的ssRNA/ssDNA和5'端为羟基的ssRNA之间的连接反应。
- 本产品连接的底物需要确保5'末端是羟基，同时3'末端是磷酸或2', 3'-环磷酸。此外，反应体系中必须加入GTP、MnCl₂。
- 如果连接底物为双链RNA或DNA，推荐使用碧云天生产的T4 RNA Ligase 2 (dsRNA Ligase) (R0632)等系列产品。
- 如果连接底物是5'末端磷酸化或腺苷酰化、3'末端是羟基的ssRNA或ssDNA，推荐使用碧云天生产的T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase) (R0621)等系列产品。
- 可根据具体应用选择合适的操作方法，可能需准备额外的试剂，如碧云天生产的RNase inhibitor (R0101/R0102/R0105/R0106)、DEPC水(DNase、RNase free) (R0021/R0022)、BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)等。
- 使用本产品进行连接反应时，如果底物过多或过少，在反应体系中加入PEG8000至终浓度为15%很多情况下可以显著提高连接效率，同时不影响反应特性。推荐使用PEG8000 (50%, RNase free) (R0056)。
- 本产品使用时宜存放在冰盒内或冰浴上，使用完毕后宜立即放置于-20°C保存。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 参考下表在冰浴中配制如下反应体系(以20μl体系为例)：

Reagent	Volume	Final Concentration
Ultrapure Water	(13-X-Y)μl	-
10X Reaction Buffer	2μl	1X
GTP (1mM)	2μl	0.1mM
MnCl ₂ (10mM)	2μl	1mM
3'-phosphate ssRNA	Xμl (10pmol)	0.5μM
5'-OH ssRNA	Yμl (10pmol)	0.5μM
RtcB Ligase (15μM)	1μl	0.75μM
Total Volume	20μl	-

注1：由于涉及RNA操作，需要严格按照RNA操作的规范进行，相关试剂和耗材须避免RNase污染，确保是RNase free的，推荐使用碧云天生产的BeyoGold™系列实验耗材及BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)进行反应体系的配制。由于涉及RNA操作，考虑到实际操作时的环境可能存在RNase污染，推荐适量添加碧云天生产的RNase Inhibitor (R0101/R0102/R0105/R0106)，尽管我们实测不添加RNase Inhibitor时也可以获得良好的连接效果。

注2：上述表格中ssRNA的用量已经比较大，对于样品比较少的情况下，完全可以大幅减少ssRNA的用量。

注3：如果同时进行多个连接反应，可以把上表中除底物之外的所有溶液和酶提前预混合，然后分装到各反应管内，最后加入底物。

注4：对于过多或过少底物的连接，可通过在反应体系中加入最终浓度为15%的PEG8000，以增强连接效果。

注5：为获得最好的底物连接效果，也可根据实际情况调整底物与RtcB Ligase的加入量，摸索最优酶促连接反应体系。

注6: RtcB Ligase的酶促连接反应须GTP和MnCl₂的参与, 请务必在反应体系中添加终浓度为0.1mM GTP和1mM MnCl₂, 以保证连接反应的正常进行。

2. 按上表配制好反应体系后, 适当轻轻混匀反应体系, 随后低速离心使粘附在管壁上的液体沉至管底。
3. 反应条件: 37°C孵育1小时。
注: 反应时间可以根据实际情况酌情适当调整。
4. 取连接后产物进行聚丙烯酰胺电泳, 拍照观察并分析连接效果。
5. 建议将反应产物通过离心柱式纯化或苯酚/氯仿萃取后乙醇沉淀的方式, 对连接产物进行纯化后再用于后续实验。
6. 其它用途请自行根据实验目的, 查阅相关文献资料进行。

常见问题:

1. 底物的二级结构或形成了双链RNA是否可能影响RtcB Ligase的连接效果?
是的。RtcB Ligase连接反应中, 底物3'端和5'端都须为单链, 并且二级结构不能影响单链末端的暴露, 以保证连接反应有效进行。
2. RtcB Ligase可以催化DNA底物的连接吗? 连接效率如何?
是的。RtcB Ligase可用于DNA (Donor)和DNA (Acceptor)、RNA (Donor)和DNA (Acceptor)之间的连接, 但连接效率非常低。
3. RtcB Ligase的最佳反应温度是多少?
RtcB Ligase在37°C条件下具有最佳酶活和连接效果。
4. 可以采用哪些方式提高RtcB Ligase的酶促连接效率?
可以通过在反应体系中加入更多的RtcB Ligase或使用RtcB Ligase (High Concentration) (R0617)、适量添加PEG8000或延长连接反应时间的方式, 来提高RtcB Ligase的连接效率。
5. 在RtcB Ligase的反应体系中, 可以使用镁或其它二价阳离子替代锰离子进行连接反应吗?
不可以。RtcB Ligase的连接反应的正常进行必须加入锰离子, 不能使用其它二价阳离子代替。
6. 在反应体系中加入聚乙二醇(PEG)分子可以提高RtcB Ligase的连接效率吗?
当加入底物的摩尔量等于RtcB Ligase时, 在反应体系中加入PEG8000并不会显著提高连接效率; 当加入底物的摩尔量超过RtcB Ligase时, 在反应体系中添加15%的PEG8000可以显著提高连接效率; 当底物量特别少时, 添加PEG8000也可能改善连接效率。

参考文献:

1. Chakravarty AK, Subbotin R, Chait BT and Shuman S. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012. 109(16):6072-7.
2. Moncan M, Rakhsh-Khorshid H, Eriksson LA, Samali A and Gorman AM. Cell Mol Life Sci. 2023. 80(12):352.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7021	T4 RNA Ligase	200U
R0021/R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml/500ml
R0051	Annealing Buffer for RNA Oligos (5X)	1ml
R0056	PEG8000 (50%, RNase free)	2ml
R0058	MgCl ₂ (100mM, DEPC-treated)	1ml
R0102	RNase Inhibitor	2kU/10kU/50kU
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0125	RNase, DNase and DNA Away	250ml
R0127	RNase, DNase, RNA and DNA Away	250ml
R0616	RtcB Ligase	25次/100次/500次
R0617	RtcB Ligase (High Concentration)	25次/100次/500次
R0621	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase)	1kU/5kU
R0632S	T4 RNA Ligase 2 (dsRNA Ligase)	1000U
R0635	T4 RNA Ligase 2, truncated	5kU/20kU/100kU
R0700S	小RNA 3'接头(5'腺苷化, 3'封闭)及连接试剂盒	20次
R0702	Universal miRNA Cloning Linker (5'腺苷化3'封闭)	1μg/5μg
R0716	5' DNA Adenylation Kit	10次/50次
ST036	DEPC	10g
ST483	PEG8000	500g
ST484	50% PEG8000 (DNase, RNase & Protease free, Sterile)	10ml/100ml
ST876	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml/500ml
ST1249	DEPC (≥97%, Reagent grade)	2ml/10ml