

## T4 RNA Ligase 2, truncated KQ

产品编号	产品名称	包装
R0637S	T4 RNA Ligase 2, truncated KQ	5kU
R0637M	T4 RNA Ligase 2, truncated KQ	20kU
R0637L	T4 RNA Ligase 2, truncated KQ	100kU

### 产品简介:

- 碧云天生产的T4 RNA Ligase 2, truncated KQ (T4 Rnl2tr KQ, or T4 Rnl2tr R55K, K227Q), 是T4 RNA连接酶2截短型的R55K和K227Q双点突变体, 可以大大减少T4 RNA Ligase 2, truncated对于RNA的非特异性连接(RNA的串联或自连成环), 并能保持和T4 RNA Ligase 2, truncated相近的酶活性。
- T4 RNA Ligase 2, truncated KQ是在T4 RNA Ligase 2, truncated (R0635)的基础上将227位的赖氨酸和55位的精氨酸分别突变为谷氨酰胺和赖氨酸, K227Q突变后大大降低了T4 RNA Ligase 2, truncated该酶所具有的轻微的从5' 预腺苷酰化的DNA接头(AppDNA)将腺苷基团转移到RNA 5' 磷酸基团同时形成5'磷酸化DNA接头(pDNA)的活性, 从而减少了T4 RNA Ligase 2, truncated导致的RNA非特异性连接(RNA串联或自连成环), 但T4 RNA Ligase 2, truncated K227Q的连接酶活性有显著下降。在T4 RNA Ligase 2, truncated K227Q基础上进一步突变R55K后, 酶的连接活性提升到了与野生型T4 RNA Ligase 2, truncated的连接活性相似的状态。
- T4 RNA Ligase 2, truncated KQ与T4 RNA Ligase 2, truncated具有类似的连接ssRNA和AppDNA的效果, 但T4 RNA Ligase 2, truncated能够使AppDNA去腺苷酰化, 形成pDNA, 而T4 RNA Ligase 2, truncated KQ对AppDNA不具有去腺苷酰化活性。
- T4 RNA Ligase 2, truncated KQ常用于microRNA (miRNA)等3'端为羟基的单链RNA在克隆、高通量测序建库或PCR检测等时, 在3'羟基端添加5'端预腺苷酰化的DNA或RNA接头。
- T4 RNA Ligase 2, truncated KQ只能利用5'端预腺苷酰化的单链DNA或RNA作为3'端接头, 因此可以大大降低连接反应的背景, 通常是小RNA等建库时的优先选择。
- T4 RNA Ligase 2, truncated KQ连接时不需要ATP, 但需要5'端预腺苷酰化(也称预腺苷化、腺苷酰化或腺苷化)底物。即使在有ATP存在的情况下, T4 RNA Ligase 2, truncated KQ也不能催化连接单链DNA或RNA 5'-P末端与3'-OH末端之间形成磷酸二酯键。而T4 RNA Ligase 1可以在ATP存在的情况下, 催化连接单链DNA或RNA 5'-P末端与3'-OH末端之间形成磷酸二酯键。因此T4 RNA Ligase 2, truncated KQ特别适用于small RNA library的制备, 不管是进行miRNA的测序还是进行directional mRNA-Seq, 该酶都可以提高建库的质量, 并有效降低连接反应的背景。
- 碧云天生产的T4 RNA Ligase 2, truncated KQ (T4 Rnl2tr KQ)催化连接AppDNA和ssRNA的效果请参见图1。

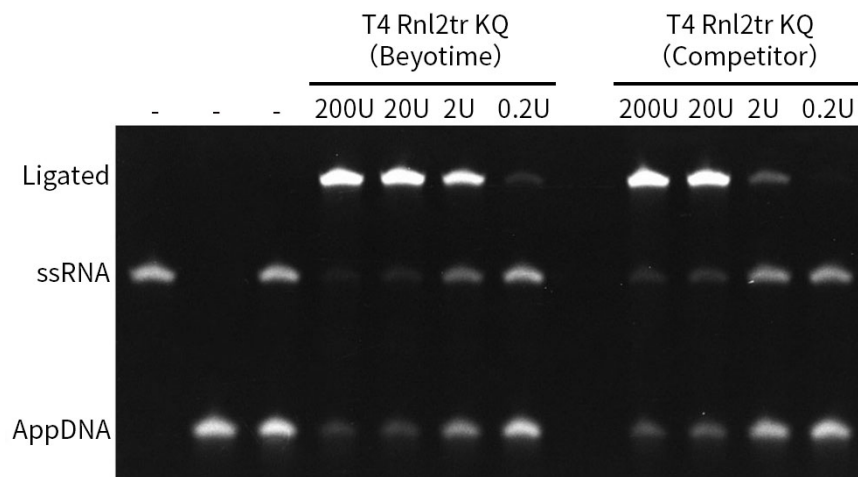


图1. 碧云天生产的T4 RNA Ligase 2, truncated KQ (R0637)和N公司的同类产品(Competitor T4 RNA Ligase 2, truncated KQ)催化连接AppDNA和ssRNA的效果图。使用本产品或国外N公司的T4 RNA Ligase 2, truncated KQ, 在20 $\mu$ l反应体系中加入图中指定量的本产品或国外N公司的T4 RNA Ligase 2, truncated KQ, 25 $^{\circ}$ C孵育60分钟进行连接反应, 反应完毕后立即取样在65 $^{\circ}$ C孵育20分钟终止反应, 加入变性上样缓冲液, 在95 $^{\circ}$ C孵育5分钟后放至冰浴中, 随后用15%尿素(7M)变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析, 最终进行核酸染色和荧光成像分析。如图所示, 本产品与N公司的产品相比, 具有类似的催化效果。

- 碧云天生产的T4 RNA Ligase 2, truncated KQ (T4 Rnl2tr KQ)与T4 RNA Ligase 2, truncated (T4 Rnl2tr)对腺苷酰化DNA (AppDNA)的去腺苷酰化效果请参考图2。

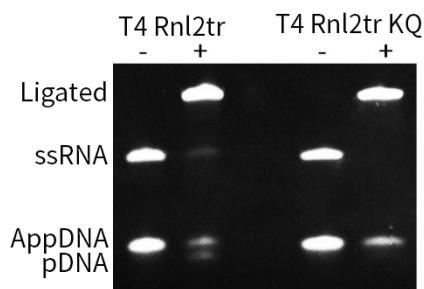


图2. 碧云天生产的T4 RNA Ligase 2, truncated KQ (R0637)与T4 RNA Ligase 2, truncated (R0635)对腺苷酰化DNA (AppDNA)的去腺苷酰化活性比较效果图。在20 $\mu$ l反应体系中加入图中指定量的本产品或T4 RNA Ligase 2, truncated, 25 $^{\circ}$ C孵育60分钟进行连接反应, 反应完毕后立即取样在65 $^{\circ}$ C孵育20分钟终止反应, 加入变性上样缓冲液, 在95 $^{\circ}$ C孵育5分钟后放至冰浴中, 随后用15%尿素(7M)变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析, 最终进行核酸染色和荧光成像分析。如图所示, 本产品与T4 RNA Ligase 2, truncated的相比, 具有类似的连接效果但是T4 RNA Ligase 2, truncated KQ对AppDNA没有去腺苷酰化活性, 而T4 RNA Ligase 2, truncated对AppDNA具有去腺苷酰化形成少量pDNA的活性。

- **用途:** 5'末端预腺苷酰化的单链DNA或者RNA与单链RNA的3'羟基末端连接; cDNA文库构建中连接5'末端预腺苷酰化单链寡核苷酸和小RNA; 链特异性的cDNA文库(Strand-specific cDNA library)构建中连接5'末端预腺苷酰化单链寡核苷酸和RNA; 二代测序中, miRNA文库构建中RNA的3'末端与接头之间的连接; cDNA文库的构建以进行小RNA转录组分析(Small-RNA transcriptome analysis)。
- **来源:** 大肠杆菌表达的重组蛋白, 表达基因为包含R55K和K227Q双突变的T4嗜菌体T4 RNA ligase 2 N端1-249位的氨基酸。
- **活性单位定义:** 200 units is defined as the amount of enzyme required to give 80% ligation of a 31-mer RNA to the pre-adenylated end of a 17-mer DNA (Universal miRNA Cloning Linker, Beyotime, Cat. No. R0702) in a total reaction volume of 20 $\mu$ l in 1 hour at 25 $^{\circ}$ C.
- **纯度:** 无DNA内切酶和外切酶活性, 无RNA酶活性, 无蛋白酶活性。
- **酶储存溶液:** 10mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT, 50% (v/v) Glycerol.
- **失活或抑制:** 65 $^{\circ}$ C加热20分钟可使T4 RNA Ligase 2, truncated KQ失活, 或加入蛋白酶K或EDTA也可以抑制其活性。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R0637S-1	T4 RNA Ligase 2, truncated KQ (200U/ $\mu$ l)	25 $\mu$ l
R0637S-2	10X T4 Rnl2tr KQ Buffer	75 $\mu$ l
R0637S-3	PEG8000 (50%, RNase free)	400 $\mu$ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R0637M-1	T4 RNA Ligase 2, truncated KQ (200U/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l
R0637M-2	10X T4 Rnl2tr KQ Buffer	300 $\mu$ l
R0637M-3	PEG8000 (50%, RNase free)	1.5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R0637L-1	T4 RNA Ligase 2, truncated KQ (200U/ $\mu$ l)	500 $\mu$ l
R0637L-2	10X T4 Rnl2tr KQ Buffer	1.5ml
R0637L-3	PEG8000 (50%, RNase free)	7.5ml
—	说明书	1份

#### 保存条件:

-20 $^{\circ}$ 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'端为羟基的单链RNA和5'端腺苷酰化的DNA或RNA之间的连接反应。
- 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 (R0102)、DEPC水(R0022)等。
- 使用本产品连接ssRNA和AppDNA时, 建议使用的PEG8000的浓度为10%-30%, 适当提高PEG8000的浓度, 会显著提高T4 RNA Ligase 2, truncated KQ的催化的连接效率, 而不改变其反应特性。

- 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. 用于连接5'端腺苷酰化并且3'端不是羟基的(例如为氨基)单链DNA (AppDNA-NH<sub>2</sub>)和3'端为羟基的单链RNA (ssRNA)的使用说明具体如下。请提前准备好待连接的样品、RNase Inhibitor (R0102)以及接头，推荐使用Universal miRNA Cloning Linker (5'腺苷化3'封闭) (R0702)或自备的适当接头。
2. 参考下表在冰浴中配制如下反应体系。

Reagent	Volume	Final Concentration
ssRNA	x $\mu$ l	0.5 or 1 $\mu$ M
DEPC-treated Water	(4-x-y) $\mu$ l	-
Universal miRNA Cloning Linker (R0702, Beyotime)	y $\mu$ l	1 or 0.5 or 2 or 1 $\mu$ M
PEG8000 (50%, RNase Free)	12 $\mu$ l	30%
10X T4 Rnl2tr KQ Buffer	2 $\mu$ l	1X
RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	2U/ $\mu$ l
T4 RNA Ligase2, truncated KQ (200U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	10U/ $\mu$ l
Total Volume	20 $\mu$ l	-

**注1：**由于涉及RNA操作，需要严格按照RNA操作的规范进行，避免RNase污染，相关试剂和耗材需要经过DEPC处理去除RNase或者确保是RNase free的。推荐在连接体系中添加RNase Inhibitor，以避免ssRNA或其连接产物的降解，尽管经测试发现在严格操作的情况下，不加RNase Inhibitor也不会导致ssRNA或其连接产物发生明显降解。

**注2：**进行连接反应时，如果样品RNA比较珍贵，希望充分被连接，可以按照接头和样品RNA的摩尔比为2:1的比例进行连接；如果样品RNA比较充裕，同时感觉接头的成本偏高时，可以按照接头和样品RNA的摩尔比1:1甚至1:2的比例进行连接反应，这样可以很好地节省接头。ssRNA的用量可以根据实际的样品量进行适当调节，相应的接头的用量也按照比例进行适当调整即可。

**注3：**如果同时进行多个连接反应，可以把上表中除ssRNA之外的所有溶液和酶提前预混合，然后再分装到各反应管内。

3. 连接反应：25 $^{\circ}$ C，孵育60分钟。**注：**为了使连接反应更加充分，可以适当延长连接反应时间。
4. 终止反应：65 $^{\circ}$ C，孵育20分钟。

### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
R0051	Annealing Buffer for RNA Oligos (5X)	1ml
R0056-2ml	PEG8000 (50%, RNase free)	2ml
R0058-1ml	MgCl <sub>2</sub> (100mM, DEPC-treated)	1ml
R0102-2kU	RNase Inhibitor	2000U
R0102-10kU	RNase Inhibitor	10000U
R0102-50kU	RNase Inhibitor	50000U
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0125	RNase, DNase and DNA Away	250ml
R0127	RNase, DNase, RNA and DNA Away	250ml
R0621S	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase, 10U/ $\mu$ l)	1000U
R0621M	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase, 10U/ $\mu$ l)	5000U
R0632S	T4 RNA Ligase 2 (dsRNA Ligase)	1000U
R0635S	T4 RNA Ligase 2, truncated	5kU
R0635M	T4 RNA Ligase 2, truncated	20kU
R0635L	T4 RNA Ligase 2, truncated	100kU
R0637S	T4 RNA Ligase 2, truncated KQ	5kU
R0637M	T4 RNA Ligase 2, truncated KQ	20kU
R0637L	T4 RNA Ligase 2, truncated KQ	100kU
R0700S	小RNA 3'接头(5'腺苷化, 3'封闭)及连接试剂盒	20次
R0702S	Universal miRNA Cloning Linker (5'腺苷化3'封闭)	1 $\mu$ g
R0702M	Universal miRNA Cloning Linker (5'腺苷化3'封闭)	5 $\mu$ g
R0716S	5' DNA Adenylation Kit	10次

R0716M	5' DNA Adenylation Kit	50次
ST1249-2ml	DEPC ( $\geq 97\%$ , Reagent grade)	2ml
ST1249-10ml	DEPC ( $\geq 97\%$ , Reagent grade)	10ml
ST036	DEPC	10g

Version 2022.10.20