

5' DNA Adenylation Kit

产品编号	产品名称	包装
R0716S	5' DNA Adenylation Kit	10次
R0716M	5' DNA Adenylation Kit	50次

产品简介:

- 碧云天生产的5' DNA Adenylation Kit, 即5' DNA腺苷酰化试剂盒, 是一种非常便捷和高效的通过酶学方法将单链DNA (ssDNA) 5' 端腺苷酰化修饰的试剂盒。
- 本试剂盒制备产生的5' 端腺苷酰化修饰的单链DNA, 常用于miRNA等3' 端为羟基的RNA或3' 端为羟基的单链DNA在克隆、高通量测序建库或PCR检测等时, 在3' 端添加的接头。
- 本试剂盒进行腺苷酰化修饰反应时, 需要腺苷酰化酶(Adenylase)、ATP和待腺苷酰化修饰的5' 端磷酸化的单链DNA。
- 本试剂盒腺苷酰化修饰效率高, 通常可以达到95%以上。对5' 端磷酸化的单链DNA进行腺苷酰化修饰反应时, 无论该单链DNA的3' 端是否进行了氨基化等封闭都可以得到高产量的腺苷酰化产物。通常本试剂盒能将95%以上的5' 端磷酸化的DNA (pDNA) 转化成腺苷酰化DNA (AppDNA), 因此腺苷酰化的产物通常不需要进行电泳切胶回收, 可以直接通常乙醇沉淀进行进一步浓缩后用于后续的连接反应。
- 本产品以5' 端磷酸化的单链DNA为底物, 腺苷酰化酶将ATP分解成AMP和PPi, AMP转移到单链DNA的5' 磷酸基团上, 形成腺苷酰化单链DNA, 从而制备出腺苷酰化接头(linker)。
- 本试剂盒催化5' 端磷酸化单链DNA生成5' 端腺苷酰化修饰单链DNA的效果参见图1。

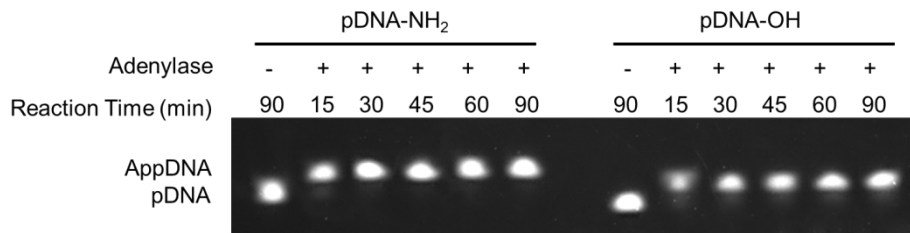


图1. 使用碧云天生产的5' DNA Adenylation Kit制备5' 端腺苷酰化修饰单链DNA的效果图。反应体系为20 μ l, 单链DNA的终浓度为5 μ M, 反应条件为65 $^{\circ}$ C分别孵育15、30、45、60和90min, 反应完毕后85 $^{\circ}$ C孵育5min终止反应。电泳上样前95 $^{\circ}$ C孵育5min随后置于冰浴以充分变性, 尿素(7M)变性聚丙烯酰胺凝胶(15%)进行凝胶电泳分析。如图所示, 本试剂盒在15min内就可以将大部分5' 端磷酸化单链DNA (pDNA)催化生成腺苷酰化的单链DNA (AppDNA), 孵育60min可以确保将95%以上的底物转化成腺苷酰化修饰的单链DNA。

- 本产品也可以用于5' 端磷酸化的单链RNA的5' 端腺苷酰化修饰, 可根据具体应用选择合适的实验步骤, 同时需要额外准备R0102 RNase Inhibitor和R0021 DEPC水等。
- 本产品包含的Adenylase来源为嗜热古细菌, 在大肠杆菌中进行表达而获得。
- **优点:** 单步反应即可完成5' 端磷酸化修饰的单链DNA或RNA的腺苷酰化修饰, 与传统的化学方法相比较, 更加简便; 对于底物转化效率高达95%以上, 无需切胶纯化仅需酒精沉淀等即可用于后续反应; 在65 $^{\circ}$ C这样一个较高的温度反应, 可以有效避免二级结构对于5' 端腺苷酰化修饰反应的干扰; 适用于pmol级别底物量的反应体系, 也可以很方便地放大至 μ mol级别底物量的反应体系。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R0716S-1	Adenylase	20 μ l
R0716S-2	10X Adenylation Reaction Buffer	25 μ l
R0716S-3	ATP (1mM)	25 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R0716M-1	Adenylase	100 μ l
R0716M-2	10X Adenylation Reaction Buffer	125 μ l

R0716M-3	ATP (1mM)	125 μ l
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，至少一年有效。

注意事项：

- 底物单链DNA或单链RNA的5'端磷酸化是必须的，3'端可以进行氨基化等封闭，也可以不封闭。
- 本试剂盒提供的腺苷酰化反应体系可以按比例放大反应体系，对腺苷酰化产物的得率无显著影响。
- 本试剂盒提供的Adenylyase的最佳反应温度为65°C，并且在25°C时会出现去腺苷酰化现象，因此反应完成后推荐在85°C孵育5min以失活Adenylyase。如果没有失活Adenylyase，后续经历室温温度条件时，会导致腺苷酰化比率下降。
- 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：

磷酸化的ssDNA或ssRNA序列 5'端腺苷酰化：

1. 解冻5'端腺苷酰化修饰反应所需的各种试剂，将Adenylyase置于冰浴上或冰盒内。
2. 参考下表在冰浴中配制如下反应体系：

Reagent	Volume	Final
Water (DNase free or DEPC-treated)	13 μ l	-
ssDNA or ssRNA (100 μ M)	1 μ l	5 μ M
10X Adenylation Reaction Buffer	2 μ l	1X
ATP (1mM)	2 μ l	0.1mM
Adenylyase	2 μ l	-
Total Volume	20 μ l	-

注意：

- a. 如果同时进行多个腺苷酰化反应，可以把上表中除ssDNA or 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。
- b. 如果涉及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。如果涉及单链RNA，推荐适量添加R0102 RNase Inhibitor。
3. 腺苷酰化反应：65°C孵育1h。个别情况为了使连接反应更加充分，可以适当延长反应时间。
4. 终止反应：85°C孵育5min。
5. 腺苷酰化产物的电泳鉴定：电泳上样前95°C孵育5min随后置于冰浴，以充分变性。尿素(7M)变性聚丙烯酰胺凝胶(15%)进行凝胶电泳分析。腺苷酰化修饰后分子量会变大一点(参考图1)。
6. 浓缩及后续用途：可以采用常规的乙醇沉淀方法进行浓缩，后续可以使用T4 RNA Ligase2, truncated (200U/ μ l)等用于和小RNA等的3'羟基的连接反应。

常见问题：

1. 腺苷酰化反应不完全或反应产物非常少。
 - a. 用于制备腺苷酰化接头时出现反应不完全的情况，建议可适当延长反应时间至2h甚至过夜。
 - b. 在不改变底物量的前提下适当增加酶量，或在不改变酶量的前提下适当减少底物量。
 - c. 当底物为ssRNA时，可能会出现ssRNA降解的情况，建议使用RNase Free的水及耗材。
 - d. 电泳条带不清晰或弥散，建议用尿素(7M)变性聚丙烯酰胺(15%)凝胶；当底物为ssDNA时，建议电泳条件为180V，50-60min；当底物为ssRNA时，建议电泳条件为50-60V，20-30min；若上样前用电泳液冲洗上样孔中的尿素，会得到更理想的电泳条带。
 - e. 放大体系在65°C水浴锅中进行反应时，反应进行1h或更长时间时，会明显观察到有白色沉淀出现，这是Adenylyase沉淀所致，这时通常底物已反应完全，所以酶的析出不会对产物的得率产生显著影响。

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 ₂ (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/μl)	1000U
R0621M	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase, 10U/μl)	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
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)	1μg
R0702M	Universal miRNA Cloning Linker (5'腺苷化3'封闭)	5μg
R0716S	5' DNA Adenylation Kit	10次
R0716M	5' DNA Adenylation Kit	50次
ST1249-2ml	DEPC (≥97%, Reagent grade)	2ml
ST1249-10ml	DEPC (≥97%, Reagent grade)	10ml
ST036	DEPC	10g

Version 2023.12.08