

PBCV-1 DNA Ligase

产品编号	产品名称	包装
D7018S	PBCV-1 DNA Ligase	1250U
D7018M	PBCV-1 DNA Ligase	5kU
D7018L	PBCV-1 DNA Ligase	25kU

产品简介:

- 碧云天生产的PBCV-1 DNA Ligase, 即PBCV-1 DNA连接酶, 也被称为PBCV DNA Ligase、SplintR™连接酶或Chorella virus DNA连接酶, 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预‘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被抑制。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’介导固定的DNA底物具有比T4 DNA ligase更强的亲和力($K_m = \sim 1\text{nM}$), 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 $10\mu\text{M}$ - 1mM 时都可以有效发挥作用; 对pH的耐受也比较高, 在pH6.5-pH9的范围内都能很好发挥作用。通常, 当 Mg^{2+} 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 Mn^{2+} 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。
- 碧云天生产的PBCV-1 DNA Ligase催化连接与互补RNA链退火的相邻DNA单链的效果参考图1。

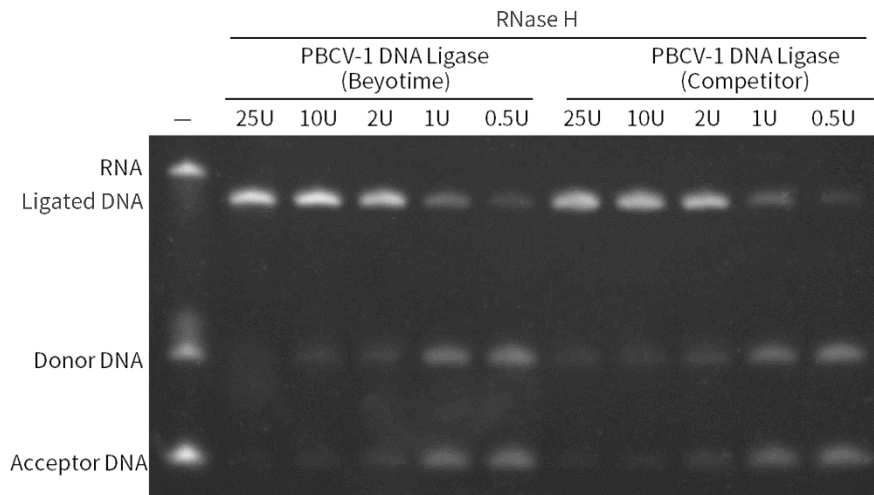


图1. 碧云天生产的PBCV-1 DNA Ligase与同类产品(Competitor)催化连接与互补RNA链退火的相邻DNA单链的效果图。为了更直观的观察PBCV-1 DNA Ligase的连接效果, 本实验利用碧云天生产的Thermostable RNase H (R7090S)催化降解连接产物中的互补RNA链, 以便于电泳时可以清晰观察到连接的DNA (ligated DNA)的电泳效果。在 $20\mu\text{l}$ 反应体系(50mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl_2 , 1mM ATP, 10mM DTT)中, 加入通过退火产生的 $2\mu\text{M}$ 的RNA:DNA杂交链, 以及图中指定量的本产品或N公司(Competitor)的PBCV-1 DNA Ligase, 25°C 孵育 15min 进行连接反应, 连接反应结束之后置于冰上 3min , 取出 $10\mu\text{l}$ 反应液加入 10U 的Thermostable RNase H(R7090S) 65°C 孵育 20min 以终止连接反应并同时消化互补的RNA单链。取出 $5\mu\text{l}$ 消化后的产物, 加入 $1\mu\text{l}$ $6\times$ DNA Loading Buffer, 95°C 变性 5min , 然后进行 7M Urea+ 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。室温条件下用 $1\times$ TBE作为电泳液, 180V 电泳 75min ; NA-Red溶液(2000:1) (D0128或D0130)室温染色 15min , 凝胶成像仪拍照观察。如图所示, 本产品与N公司的产品相比, 具有类似的催化与互补RNA链退火的相邻DNA单链进行连接的效果。

- **用途:** 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。

- **来源：**PBCV-1 DNA Ligase基因通过*E.coli*菌株表达纯化而获得。
- **活性定义：**One unit is defined as the amount of enzyme needed to ligate (to 50% completion) 2 picomoles of a tripartite FAM-labeled DNA:RNA hybrid substrate in a 20µl reaction at 25°C in 15 minutes in 1X Ligation Buffer.
- **纯度：**不含DNA内切酶和外切酶，不含RNA酶，不含磷酸酯酶。
- **酶储存液：**10mM Tris-HCl (pH7.4, 25°C), 300mM NaCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 50% (v/v) Glycerol.
- **10X Reaction Buffer：**500mM Tris-HCl (pH7.5, 25°C), 100mM MgCl₂, 10mM ATP, 100mM DTT.
- **失活或抑制：**65°C加热20min。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D7018S-1	PBCV-1 DNA Ligase (25U/µl)	50µl
D7018S-2	10X Reaction Buffer	150µl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7018M-1	PBCV-1 DNA Ligase (25U/µl)	200µl
D7018M-2	10X Reaction Buffer	600µl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7018L-1	PBCV-1 DNA Ligase (25U/µl)	1ml
D7018L-2	10X Reaction Buffer	1.5ml × 2
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存。

注意事项：

- PBCV-1 DNA Ligase被一价阳离子所抑制，建议一些常见的盐如NaCl、KCl等在反应中应保持在50mM以下。为了保持该酶的贮存稳定性，酶被提供在含有300mM NaCl的储存缓冲液中。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。
- 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10-60min之间，对于很多实验来说，推荐的连接反应时间为15min。
- 在反应体系中PBCV-1 DNA Ligase的最终浓度建议在100nM-1µM之间。碧云天生产的PBCV-1 DNA Ligase的浓度约为13µM。建议在连接反应中将酶的浓度至少设为底物浓度的2~3倍。
- 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1µM。
- 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的终浓度调整到10µM以提高连接效率。
- 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。
- PBCV-1 DNA Ligase连接效率会随着‘夹板’RNA长度的减少(50bp-20bp)而逐渐降低，当RNA‘夹板’长度小于等于10nt时，连接效率基本为零。
- 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. 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20µM，在10-50µM范围内均可，90°C孵育1min，然后通过梯度降温至25°C退火形成DNA/RNA杂合双链。推荐使用碧云天生产的R0051 Annealing Buffer for RNA oligos (5X)，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
DEPC-treated Water	15µl	-
10X Reaction buffer	2µl	1X
Nicked DNA/RNA Substrate (1µM)	2µl	0.1µM
PBCV-1 DNA Ligase (25U/µl)	1µl	1.25U/µl

Total Volume	20μl	-
---------------------	----------------------------	---

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15-60min。
4. 终止：65°C孵育20min；或加EDTA以灭活。
5. 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。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D7006	T4 DNA Ligase	40,000U
D7008	T4 DNA Ligase	200,000U
D7002	快速DNA连接试剂盒	100次
D7003	快速DNA连接试剂盒	500次
D7010S	Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒)	20次
D7010M	Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒)	100次
D6952S	牛痘DNA拓扑异构酶I	200U
D6952M	牛痘DNA拓扑异构酶I	1000U
D6952L	牛痘DNA拓扑异构酶I	5000U
D7021	T4 RNA Ligase	200U
R0621S	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase)	1000U
R0621M	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase)	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
R7090S	Thermostable RNase H	250U
R7090M	Thermostable RNase H	1000U
R7090L	Thermostable RNase H	5000U
R0051	Annealing Buffer for RNA Oligos (5X)	1ml
D0251	Annealing Buffer for DNA Oligos (5X)	1ml
D7018S	PBCV-1 DNA Ligase	1250U
D7018M	PBCV-1 DNA Ligase	5kU
D7018L	PBCV-1 DNA Ligase	25kU

Version 2023.12.05