



T4 RNA Ligase 1

Nr kat.	Opakowanie
E1059-01	1 000 U

Stężenie: 10 000 U/ml

Definicja jednostki: Jedna jednostka to ilość enzymu potrzebna do przekształcenia 1 nmola 5'-[³²P]rA₁₆ w formę odporną na fosfatazę, w ciągu 30 minut w 37°C.

Kontrola jakości: Wszystkie preparaty są testowane pod kątem zanieczyszczenia endonukleazami, egzonukleazami, nieswoistymi RNazami oraz aktywności jedno- i dwuniciowych DNaz. Preparat ma czystość większą niż 90%, weryfikowaną metodą SDS-PAGE.

Literatura:

- Uhlenbeck, O.C., Gumpert, R.I., T4 RNA ligase, *The Enzymes*, 15B, 31-60, Academic Press Inc., 1982.
- Middleton, T., et al., Synthesis and purification of oligoribonucleotides using T4 RNA ligase and reverse-phase chromatography, *Anal. Biochem.*, 144, 110-117, 1985.
- Brennan, C.A., et al., Using T4 RNA ligase with DNA substrates, *Meth. Enzymol.*, 100, 38-52, 1983.
- Tessier, D.C., et al., Ligation of single-stranded oligodeoxyribonucleotides by T4 RNA ligase, *Anal. Biochem.*, 158, 171-178, 1986.
- Heckler, T.G., et al., T4 RNA ligase mediated preparation of novel "chemically misacylated" tRNA P_{he}, *Biochemistry*, 23, 1468-1473, 1984.
- Edwards, J.B., et al., Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5'-ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification, *Nucleic Acids Res.*, 19, 5227-5232, 1991.

T4 RNA Ligase 1 katalizuje reakcję ligacji pomiędzy resztą fosforanową końca 5' i resztą hydroksylową końca 3' RNA lub DNA. Enzym katalizuje reakcję tworzenia wiązania 3' → 5' fosfodiesterowego z hydrolizą ATP do AMP i PPI. Substratami reakcji są jednoniciowy RNA i DNA oraz pirofosforany dinukleozydów.

Zastosowanie:

- Znakowanie końca 3' RNA za pomocą cytydyno 3',5'-bis[α-³²P] fosforanu (1).
- Łączenie RNA z RNA (2).
- Synteza oligorybonukleotydów i oligodeoksyrybonukleotydów (3, 4).
- Specyficzne modyfikacje tRNA (5).
- Ligacja oligodeoksyrybonukleotydów do cDNA w 5'-RACE (szybka amplifikacja końców cDNA) (6).

Źródło: Szczep *E. coli* zawierający klon genu ligazy T4 RNA.

Bufor do przechowywania: 20 mM HEPES (pH 7,4), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 50% glicerol.

T4 RNA Ligase Reaction Buffer (1x): 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT.

Przykładowa reakcja ligacji RNA-RNA (20 μl):

Składnik:	Ilość:
10 x T4 RNA Ligase Reaction Buffer	2 μl
RNase Inhibitor (E4210)	20 U
ATP	1 mM
DMSO (opcjonalnie)	10%
ssRNA akceptor z wolną grupą 3' -OH	20 pmol
RNA donor z wolną grupą 5' -PO ₄ i zablokowanym 3' końcem	do 200 pmol
T4 RNA Ligase 1	10 U
RNase-free Water	do 20 μl

Prowadzić inkubację w 25°C przez 2 godziny lub w 16°C przez 16 godzin, następnie oczyścić produkt reakcji w celu przygotowania RNA do dalszych eksperymentów.