



产品组分

组分名称	组分目录号	规格-1	规格-2
		1250 U	6250 U
PBCV-1 DNA Ligase	RM21516	1 × 50 µL	1 × 250 µL
10×PBCV DNA Ligase Reaction Buffer	RM20808	1 × 100 µL	1 × 500 µL

产品说明

PBCV-1 DNA Ligase, 也被称作 PBCV DNA Ligase, SplintR™ Ligase 或 Chovella virus DNA Ligase, 是一种 ATP 依赖的 DNA 连接酶, 能够有效地催化以互补 RNA 链为夹板的两条相邻 DNA 单链的连接。在 16-37 °C 之间均有活性。

常见应用于基于探针法的 microRNA 等小 RNA 的检测, 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。

产品来源

由携带编码 *PBCV-1 DNA Ligase* 基因的质粒在大肠杆菌中重组表达并经过多步纯化精制而成。

活性定义

1 活性单位 (U) 指在 20 µL 反应体系中, 使用 1X PBCV DNA Ligase Reaction Buffer, 25°C 孵育 15 min, 连接 50% 的 2 pmol 三重 FAM 标记的 DNA/RNA 杂交底物所需的酶量。

酶存储液

10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, pH 7.4 @ 25°C

保存温度

-20°C 保存, 用蓝冰运输, 避免干冰保存

反应条件

1 X PBCV DNA Ligase Reaction Buffer, 25°C 孵育

1×PBCV DNA Ligase Reaction Buffer 组成

50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM ATP, 10mM DTT, pH 7.5 @ 25°C

热失活

65°C 加热 20min

操作说明

1. 按下表所示在冰上加入各反应组分 (以 20 µL 反应体系为例):

组分	用量
10 × PBCV DNA Ligase Reaction Buffer	2 µL
底物 (1 uM)	2 µL
PBCV-1 DNA Ligase	1 µL
ddH ₂ O	Up to 20 µL

- 各反应组分混匀并短暂离心收集溶液到管底;
- 置于 25°C 孵育 15-60 min;
- 置于 65°C 孵育 20 min 使连接酶失活;
- 将反应产物置于冰上进行下游实验, 或 -20°C 保存。

注意事项

1. 一价阳离子会抑制 PBCV-1 DNA Ligase 的活性。建议在连接反应体系中确保一价阳离子（如：NaCl、KCl）添加浓度低于 50 mM。PBCV-1 DNA Ligase 已保存在含 300 mM NaCl 的储存缓冲液中，以确保储存的稳定性。建议添加到反应中之后，酶至少稀释 6 倍，最佳稀释度小于 10 倍。
2. PBCV-1 DNA Ligase 反应应当在 16-37°C 之间进行。我们建议初始测试在 25°C 条件下进行。
3. 如果反应没有按预期有效进行，建议延长反应时间，而不是增加反应中的酶浓度。
4. 在连接位点 5'端第一个碱基对为 dG/C 或 dC/G 时，连接效率会部分降低；当 5'端前两个碱基对均为 dG/C 或 dC/G 时，连接效率会进一步降低。
5. 对于连接效率较低的底物（如连接位点 5'端第一个碱基对为 dG/C 或 dC/G），建议将 ATP 终浓度提高至 10 μ M。
6. 建议反应底物中 RNA 片段包含至少 20 个碱基（若 RNA 片段长度小于 10 个碱基，基本不会发生连接反应）。