

## 小RNA 3'接头(5'腺苷化, 3'封闭)及连接试剂盒

产品编号	产品名称	包装
R0700S	小RNA 3'接头(5'腺苷化, 3'封闭)及连接试剂盒	20次

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的小RNA 3'接头(5'腺苷化, 3'封闭)及连接试剂盒(Small RNA 3'-Linker (5'adenylated, 3'blocked) and Ligation Kit), 是一种提供了5'腺苷化和3'封闭的Universal miRNA Cloning Linker及相应的连接酶和配套试剂, 用于miRNA等3'端为羟基的小RNA和接头连接的试剂盒。3'端连接了接头的小RNA后续可以用于其克隆、高通量测序建库或PCR检测等。
- 本试剂盒也可以用于3'端为羟基的单链DNA和接头的连接, 因此也可以称为单链DNA 3'接头(5'腺苷化, 3'封闭)及连接试剂盒(ssDNA 3'-Linker (5'adenylated, 3'blocked) and Ligation Kit), 或核酸3'接头(5'腺苷化, 3'封闭)及连接试剂盒(3'-Linker (5'adenylated, 3'blocked) and Ligation Kit)。
- 本试剂盒提供的Universal miRNA Cloning Linker, 其5'端腺苷酰化(也称5'端预腺苷酰化或5'端预腺苷化, 5' pre-adenylated或5' pre-adenylation), 3'端氨基封闭, 可以用于3'端为羟基的RNA的3'端接头的添加。本试剂盒中提供的T4 RNA Ligase2, truncated可以识别“活化”的5'端腺苷酰化的Universal miRNA Cloning Linker, 在无需ATP存在的条件下, 可将Universal miRNA Cloning Linker的5'端与另外一条单链寡核苷酸的3'端羟基共价连接。
- 使用本试剂盒和miRNA连接时, 可以有效避免miRNA的自连、不同miRNA之间的连接、Linker的环化或Linker分子之间的连接, 而仅发生Linker 5'端和miRNA 3'羟基之间的特异性连接。
- 本试剂盒催化连接Universal miRNA Cloning Linker和ssRNA的效果请参见图1。

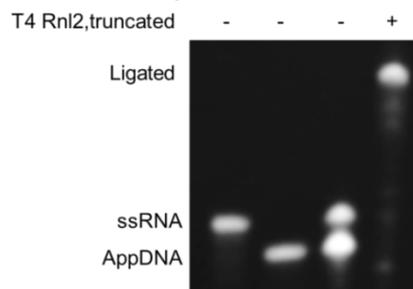


图1. 碧云天生产的小RNA 3'接头(5'腺苷化, 3'封闭)及连接试剂盒催化连接Universal miRNA Cloning Linker (AppDNA)和ssRNA的效果图。反应体系为20 $\mu$ l, Universal miRNA Cloning Linker (AppDNA)的终浓度为1 $\mu$ M, 单链RNA的终浓度为0.5 $\mu$ M, 反应条件为25 $^{\circ}$ C孵育60min, 反应完毕后立即取样在65 $^{\circ}$ C孵育20min终止反应, 加入变性上样缓冲液并在95 $^{\circ}$ C孵育5min后放至冰浴中, 随后用15%尿素(7M)变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 最终进行核酸染色和荧光成像分析。如图所示, 本试剂盒催化连接Universal miRNA Cloning Linker和ssRNA的效率非常高。

- 本试剂盒提供的Universal miRNA Cloning Linker的序列是: 5'-rAppCTGTAGGCACCATCAAT-NH<sub>2</sub>-3'。该序列同NEB公司的S1315S Universal miRNA Cloning Linker。
- 本试剂盒如果用于20 $\mu$ l的反应体系, 并按照本试剂盒推荐的连接体系, 可以用于20次的Universal miRNA Cloning Linker和ssRNA的连接反应。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R0700S-1	Universal miRNA Cloning Linker (6.9 $\mu$ M)	29 $\mu$ l
R0700S-2	DEPC-treated Water	100 $\mu$ l
R0700S-3	PEG8000 (50%, RNase Free)	300 $\mu$ l
R0700S-4	RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
R0700S-5	T4 RNA Ligase2, truncated (200U/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
R0700S-6	10X T4Rnl2, truncated Buffer	50 $\mu$ l
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 至少一年有效。

## 注意事项:

- 本试剂盒附带提供的试剂均用DEPC水配制, 可直接用于底物为单链RNA (3'端需为羟基)和Universal miRNA Cloning Linker (5' adenylated, 3' blocked) 的连接反应。
- 使用本试剂盒连接ssRNA和Universal miRNA Cloning Linker (5' adenylated, 3' blocked)时, 建议使用的PEG8000的浓度为10%-30%, 适当提高PEG8000的浓度, 会显著提高连接效率。
- 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Universal miRNA Cloning Linker和单链RNA (ssRNA)的3'羟基末端时, 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 $\mu$ M
DEPC-treated Water	2.55-x $\mu$ l	-
Universal miRNA Cloning Linker (6.9 $\mu$ M)	1.45 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
PEG8000 (50%, RNase Free)	12 $\mu$ l	30%
10X T4 Rnl2, truncated Buffer	2 $\mu$ l	1 X
RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	2U/ $\mu$ l
T4 RNA Ligase2, truncated	1 $\mu$ l	-
Total Volume	20 $\mu$ l	-

### 注意:

- a. 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, 尽管经测试我们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。
  - b. 进行连接反应时, 通常推荐ssRNA和linker按照1:1进行连接反应, 以适当节约本试剂盒。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, 同时感觉本试剂盒的成本偏高时, 可以按照接头和样品RNA的摩尔比摩尔比1:1甚至1:2的比例进行连接反应, 这样可以很好地节省本试剂盒。
  - c. 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。
2. 连接反应: 25°C, 孵育 60min。为了使连接反应更加充分, 可以适当延长连接反应时间。
  3. 终止反应: 65°C, 孵育 20min。

## 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
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

Version2020.03.22