

**描述:** ssDNA/RNA CircLigase 为热稳定的 DNA/RNA 连接酶, 不依赖于 ATP, 可催化单链 DNA 或单链 RNA 的分子内环化。环化反应中, 要求催化底物单链 DNA/RNA 具有 5'-磷酸基团和 3'-OH 基团。对于大于 15nt 的单链底物, 该酶都能高效的连接。

#### 组分

| 名 称                             | 2000U  | 20kU   |
|---------------------------------|--------|--------|
| ssDNA/RNA CircLigase (100 U/μl) | 20 μl  | 200 μl |
| 2.5×CircLigase Buffer2          | 0.2 ml | 1 ml×2 |
| 50mM MnCl <sub>2</sub>          | 0.5 ml | 0.5 ml |

**活性定义:** 60°C 1h 条件下, 催化 1pmol 5'-磷酸化的 ssDNA 底物环化, 所需的酶量定义为 1Unit。

**储存:** -20°C 可保存 3 年。

#### 反应实例

##### 1. 按以下组分配制反应液

|                        |             |
|------------------------|-------------|
| CircLigase (100 U/μl)  | 1 μl        |
| 5'磷酸化 ssDNA/RNA        | 10-100 pmol |
| 2.5×CircLigase Buffer2 | 8 μl        |
| 50mM MnCl <sub>2</sub> | 1 μl        |
| ddH <sub>2</sub> O     | Up to 20 μl |

60°C 孵育 60min 进行环化反应。

##### 2. 失活反应

反应结束后, 可加入终浓度 10 mM EDTA 终止反应。或采用加热方式 85°C 10min 加热失活。

#### 使用注意事项:

- (1) 环化底物 ssDNA 或 RNA 必须带有 5'磷酸基团, 3'端含有 OH。该酶对底物的末端碱基, 具有偏好性。推荐 5'首碱基为 G (连接效率 G>A, T 和 C 几乎不连接)。3'末端推荐 T 或 A 碱基 (T≥A>>G/C)。
- (2) 环化体系中的 ATP 浓度高于 20μM 以上时会极大抑制环化效率, 甚至导致环化失败。因此建议底物为纯化产物。
- (3) 该酶在 50-70°C 条件下均具有活性, 最佳反应温度为 60°C, 必要时可自行调整。
- (4) 本酶主要进行分子内环化连接, 分子间的连接未检测到。
- (5) 本酶对 ssDNA 和 RNA 的环化效率极高, 多数情况下, 90%以上的底物被环化。未被环化的 ssDNA 可通过加入 0.25U/μl 的 Exonuclease I, 37°C 消化 15min 去除, 以获得高纯度的环化 ssDNA。未环化的 ssRNA, HaiGene 将稍后给出去除方案。
- (6) 本酶可以连接 15-nt 以上的核苷酸, HaiGene 测试的最长 ssDNA 为 110nt (连接效率>90%)。
- (7) 在小体系实验时注意体系的蒸发, 可加入矿物油以防止蒸发。