

描述：PBCV DNA 连接酶也称为 SplintR 连接酶或 Chorella 病毒 DNA 连接酶，它能够高效催化相邻的 DNA 核苷酸的连接，这个连接过程需要一条互补的 RNA 在两条 DNA 单链间起“夹板”或“桥梁”的固定作用。PBCV DNA 连接酶的这种活性远远优于传统的 T4 DNA 连接酶，有助于 miRNAs 和 mRNAs，包括 SNPs 在内的研究方法的创新。另外，在二代测序和分子诊断等众多领域中，PBCV DNA 连接酶是富集目的基因的理想选择。它具有稳定的生物活性，对 RNA 介导固定的 DNA 底物亲和性强（米氏常数 $K_m = 1 \text{ nM}$ ），能够在复杂的混合物中检测到亚纳摩尔级的特定 RNA。因此，在 RNA 检测技术中，PBCV DNA 连接酶不失为最佳选择用酶。

组分

名称	1250U	5KU
PBCV DNA Ligase (25 U/ μl)	50 μl	200 μl
10×PBCV Ligation Buffer	250 μl	1ml

储存：-20°C 可保存 3 年。

活性定义：1 单位指 20 μl 反应体系中，1×PBCV 连接酶反应缓冲液，16°C 条件下，15 分钟内能使 2 pmol 的 DNA:RNA 杂交底物连接反应完成 50% 所需的酶量。

应用：

- 单链 DNA 的连接
- 基于探针法的 miRNA 的检测
- SNP 或剪接体的检测
- RASL 分析

反应温度及失活

该酶的最佳反应温度为 25°C，可在 16-37°C 之间优化；37°C 可明显提高反应的特异性；该酶在 65°C 加热 20min 即可失活。

注意事项

1. 1×PBCV Ligation Buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM MgCl_2 , 0.1mM ATP, 10 mM DTT。
2. 该酶对 ATP 的要求比较宽泛，10-100 μM ATP 范围内都可发挥活性，5 mM Mg^{2+} 可显著增加连接产物的量，最佳 pH 为 7.5-8.0。
3. 该酶对一价阳离子非常敏感，如 NaCl 或 KCl 的浓度应低于 50 mM，100 mM 的 NaCl 会完全抑制连接反应。
4. 该酶的反应温度为 16~37°C，随着温度的上升酶活性会提高，但此时腺苷化产物也随之增加，最佳温度为 25°C。
5. 连接效率随着夹板 RNA 长度的减少而降低，当长度小于等于 10nt 时，连接效率为零。
6. 供体的 5'端第一个碱基为“A/T”时连接效率最高。
7. 受体的 3'端第一个碱基为“T”时连接效率最高，3'端第一个碱基为“G”时连接效率最差。

使用方法

1. 底物和夹板退火

建议反应体系中底物浓度在 50 nM~2 μM 之间，体系中酶的浓度低于 1 μM （该 SplintR 酶为 10 μM ）。在连接反应中，酶的浓度可设为底物浓度的 2~3 倍。将等摩尔浓度的底物混合均匀，75°C 2min 后缓慢降温至室温。

2. 连接反应

退火后产物 (1 μM)	2 μl
10×PBCV Ligation Buffer	2 μl
PBCV DNA Ligase	1 μl
灭菌水	up to 20 μl

25°C 反应 15-60min。

3. 65°C 加热 20min，使酶失活。