

## T4 RNA Ligase 2, GMP Grade

REF: GMP109-S/M

### 储运条件

-20 ± 5°C保存, 有效期 24 个月。运输条件: ≤ 0°C。

### 产品组成

组分	规格 S	规格 M
T4 RNA Ligase 2, GMP Grade (10 U/μl)	100 μl	500 μl
10× T4 Rnl2 Buffer, GMP Grade	1 ml	2×1 ml

### 产品描述

T4 RNA Ligase 2, GMP Grade 是一种 ATP 依赖的双链 RNA 连接酶, 具有 RNA 链分子间和分子内连接活性。与 T4 RNA Ligase 1 相比, 该酶对双链 RNA 切刻的连接活性要明显高于对单链 RNA 的末端连接, 且需要 5' 磷酸基和 3' 羟基相邻才能连接。此外, 该酶还能在双链结构中, 连接 RNA 的 3' 羟基和 DNA 的 5' 磷酸基。

本品采用符合 GMP 规范的生产与质量管理体系, 保证生产过程以及原辅料全程可追溯。整个生产过程不使用抗生素和任何动物来源的原料及辅料, 对宿主蛋白、外源 DNA、非特异性内切酶、DNase、RNase 等工艺相关杂质, 以及微生物限度、细菌内毒素等进行严格控制。本品满足疫苗与药物生产等领域对原辅料的要求。

### 活性定义

1 个活性单位 (U) 是指在 37°C 下, 30 min 内连接 0.4 μg 23-mer 和 17-mer RNA 的等摩尔混合物所需的酶量。

### 失活条件

80°C, 5 min。

### 质量控制

#### 蛋白纯度

经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 蛋白检测纯度不低于 95%。

#### 内切酶活性

37°C 下, 在 20 μl T4 Rnl2 Buffer, GMP Grade 反应体系中将 10 U T4 RNA Ligase 2, GMP Grade 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h 后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 少于 10% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

#### DNase 活性

37°C 下, 在 20 μl T4 Rnl2 Buffer, GMP Grade 反应体系中将 10 U T4 RNA Ligase 2, GMP Grade 与 15 ng 双链 DNA 片段共同温育 16 h 后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 双链 DNA 片段无变化。

#### RNase 活性

37°C 下, 在 10 μl T4 Rnl2 Buffer, GMP Grade 反应体系中将 10 U T4 RNA Ligase 2, GMP Grade 与 500 ng RNA 共同温育 1 h 后, 使用琼脂糖凝胶电泳检测, 不低于 90% 的 RNA 仍保持完整。

#### 磷酸酶活性

200 μl 反应体系中加入 100 U 本酶和 2.5 mM p-Nitrophenyl Phosphatase (PNPP), 37°C 孵育 4 h, 碱性磷酸酶活性 < 0.0001 U。

#### 宿主 DNA 残留

采用中国药典 2020 版四部通则 3407 外源性 DNA 残留量测定法第三法定量 PCR 法, 本品中大肠杆菌宿主细胞 DNA 残留量 < 10 拷贝 / 100 U。

#### 宿主蛋白残留

采用中国药典 2020 版四部通则 3412 大肠埃希菌菌体蛋白质残留量测定法, 本品中大肠杆菌菌体蛋白质残留量低于 50 ppm。

#### 微生物限度检测

采用中国药典 2020 版四部通则 1105 非无菌产品微生物限度检查: 微生物计数法, 本品需氧菌总数 ≤ 1 cfu/ml, 霉菌和酵母菌总数 ≤ 1 cfu/ml。

#### 细菌内毒素残留

采用中国药典 2020 版四部通则 1143 细菌内毒素检查法第一法凝胶法, 本品中细菌内毒素残留低于 0.25 EU/KU。

#### 支原体检测

采用支原体检测试剂盒 (LAMP 法) 检测 10 U T4 RNA Ligase 2, GMP Grade, 结果为阴性。

#### 重金属残留

采用中国药典 2020 版四部通则 0821 重金属检查法第一法, 本品重金属残留低于 10 ppm。

### 使用方法

#### 1. dsRNA 切刻的连接

- RNA 底物制备: 用 65°C, 3 min 预处理 RNA 底物 (切刻 dsRNA), 冰浴 2 min。
- 在冰上配制如下反应体系:

组分	建议加入量	终浓度
10× T4 Rnl2 Buffer, GMP Grade	2 μl	1×
T4 RNA Ligase 2, GMP Grade (10 U/μl)	1 μl	0.5 U/μl
切刻 dsRNA (10 μM)	2 μl	1 μM
Nuclease-Free Water	up to 20 μl	-

- 充分混匀并瞬间后, 25°C 温育 1 h。
- 反应结束后, 向产物中加入蛋白酶 K 或 EDTA 以终止反应。

### 注意事项

- 本品所附的 10× T4 Rnl2 Buffer, GMP Grade 适用于连接双链 RNA 切刻。Buffer 的 Mg<sup>2+</sup> 终浓度为 2 mM, 如要连接 RNA/DNA 杂合链切刻, 可适当提高 Mg<sup>2+</sup> 浓度 (不超过 10 mM), 或添加 10~15% 的 PEG 8000。
- 为防止 RNase 污染, 可以添加 RNase 抑制剂, 操作时需穿戴干净的手套、口罩, 实验所用枪头、离心管等耗材均为 RNase-free。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并佩戴一次性手套及口罩进行实验操作。