Single strand DNA Ligase

Code No. NN005A **Size: 20 U (for 20 reactions)**
Conc.: 1 U/μl

Supplied Reagents:

2X Single strand DNA Ligase buffer	**400 μl**
ATP (10 mM)	**20 μl**

Description:
Single strand DNA Ligase is a enzyme that catalyzes the formation of phosphodiester bonds between 3′-OH termini and 5′-P termini to ligate Single strand DNA (ssDNA) to ssDNA, requiring ATP as a cofactor. Additionally, Single strand DNA Ligase catalyzes the formation of phosphodiester bonds between 3′-OH termini and 5′-App termini to ligate ssDNA to ssDNA without requiring ATP as a cofactor.

Single strand DNA Ligase can perform ligation on the following substrates.
- ssDNA and ssDNA
- ssDNA and ssRNA
- ssRNA and ssRNA

Features:
- Suitable for intermolecular ligation
- Facilitates easy connection of ssDNA, which was challenging with conventional products
- High ligation efficiency
- Capable of connecting regardless of the types of single-stranded nucleic acid

Storage: -20℃

Unit Definition:
One unit is defined as the amount of enzyme that ligates more than 80% of 1 pmol of 50 base single-stranded DNA in a 25 μl mixture in 4 hours at 37℃.

Reaction Conditions:
- Reaction temperature: 25 to 60℃ (Optimal temperature: 37℃)
- Reaction time: 15 minutes to 16 hours

Inactivation Conditions:
80℃ to 95℃ for 10 minutes

Quality Control Data:
Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

Applications:
1. Ligation of ssDNA and ssDNA
2. Ligation of ssDNA and ssRNA
3. Ligation of ssRNA and ssRNA
4. Labeling of the 3′-OH termini of ssDNA and ssRNA
5. PCR or RT-PCR based on adapters
6. Sample preparation for NGS (next-generation sequencing)

Precautions for Use:
- If the template has modifications at the 3′ termini or lacks a 3′-OH termini, ligation between 3′-OH termini of the template and 5′-P termini of the adapter will be inhibited.
- If the template is double-stranded DNA, denaturation prior to the ligation reaction is recommended.

Application Example (Adapter Ligation to the 3′ termini of ssDNA/RNA):
1. To ligate 3′-OH termini of ssDNA and 5′ termini of adapter ssDNA, prepare the reaction mixture in a microtube by combining the following in a total volume of 25 μl.
2. Incubate at 37℃ for 15 minutes to 16 hours.
3. Stop the reaction by heating at 80℃ for 10 minutes.

< Phosphorylated adapters with ATP-dependent Reaction >

Components	Volume	Final conc.
Single strand DNA Ligase (1 U/μl)	1 μl	0.04 U/μl
2X Single strand DNA Ligase buffer	12.5 μl	1X
ATP (10 mM)	1 μl	0.4 mM
5′-phosphorylated adapters*1,2	25 pmol	1 pmol/μl
Template	1 - 5 pmol	0.04 - 0.2 pmol/μl
Nuclease-Free Water	up to 25 μl	

< Adenylated adapters with non-ATP-dependent Reaction >*3

Components	Volume	Final conc.
Single strand DNA Ligase (1 U/μl)	1 μl	0.04 U/μl
2X Single strand DNA Ligase buffer	12.5 μl	1X
5′-adenylated adapters*1,2	25 pmol	1 pmol/μl
Template	1 - 5 pmol	0.04 - 0.2 pmol/μl
Nuclease-Free Water	up to 25 μl	

*1 To prevent self-ligation of adapters, it is recommended to add a blocking modification to the 3′ termini of adapters, such as an amino modification.
*2 When using synthetic oligos for adapters, it is recommended to ensure the purification purity is either HPLC or PAGE.
*3 By using non-ATP-dependent reactions, ligation can be achieved in short time and with higher efficiency.

Reference:
Miura, Fumihito *et al*. Identification of an enzyme with strong single-stranded DNA ligation activity and its application for sequencing. *Nucleic acids research*. (2025) **53**: 3.

v202505Da

Single strand DNA Ligase

Code No. NN005A　　容量：　20 U（20 回反応分）
濃度：　1 U/μl

添付試薬：

2×Single strand DNA Ligase buffer	400 μl
ATP（10 mM）	20 μl

● 製品説明
Single strand DNA Ligase は一本鎖 DNA 同士を連結できる酵素である。本酵素は一本鎖 DNA の 5′-P 末端と 3′-OH 末端をホスホジエステル結合で連結する酵素であり、連結する際に補酵素として ATP を要求する。また、一本鎖 DNA の 5′-App 末端と 3′-OH 末端をホスホジエステル結合で連結する酵素でもあり、連結する際に補酵素として ATP を要求しない。

本酵素は以下の基質のライゲーションを行うことが可能である。
・一本鎖 DNA と一本鎖 DNA
・一本鎖 DNA と一本鎖 RNA
・一本鎖 RNA と一本鎖 RNA

● 特長
・分子間ライゲーションに適した酵素
・従来品では困難であった一本鎖 DNA 同士の連結が容易
・高いライゲーション効率
・一本鎖核酸の種類を問わず、連結が可能

● 保存　－ 20℃

● 活性の定義
1 pmol/25 μl の一本鎖 DNA（50 塩基）を、37℃で 4 時間の間に 80% 以上ライゲーションさせる酵素活性を 1 U とする。

● 反応条件
・反応温度：25～60℃（最適温度は 37℃）
・反応時間：15 分～16 時間

● 失活条件
80～95℃ 10 分

● 品質管理データ
性能試験結果については、各ロットの Certificate of Analysis（CoA）をご覧ください。CoA はタカラバイオウェブサイトからダウンロードできます。

● 用途
1. 一本鎖 DNA 同士の連結
2. 一本鎖 RNA 同士の連結
3. 一本鎖 RNA と一本鎖 DNA との連結
4. 一本鎖 DNA および一本鎖 RNA の 3′-OH 末端の標識
5. アダプターを起点とした PCR や RT-PCR
6. NGS（next-generation sequencing）用のサンプル調製

● 使用上の注意
・Template（一本鎖 DNA/RNA）の 3′-OH 末端とアダプターの 5′-P 末端をライゲーションさせる場合、Template に 3′ 末端の修飾もしくは 3′-OH 末端の欠損があると、当該末端へのライゲーションは阻害される。
・Template が二本鎖 DNA の場合、反応前に変性を行う。

● 使用例（一本鎖 DNA/RNA の 3′ 末端へのアダプターライゲーション）
1. マイクロチューブ内で以下の反応液を調製し、全量を 25 μl とする。
2. 37℃ 15 分～16 時間で反応を行う。
3. 80℃ 10 分間で反応を停止させる。

＜ATP 依存的反応＞

試薬	使用量	最終濃度
Single strand DNA Ligase（1 U/μl）	1 μl	0.04 U/μl
2×Single strand DNA Ligase buffer	12.5 μl	1×
ATP（10 mM）	1 μl	0.4 mM
5′ 末端リン酸化アダプター＊1、2	25 pmol	1 pmol/μl
Template	1～5 pmol	0.04～0.2 pmol/μl
Nuclease-Free Water	up to 25 μl	

＜ ATP 非依存的反応＞＊3

試薬	使用量	最終濃度
Single strand DNA Ligase（1 U/μl）	1 μl	0.04 U/μl
2×Single strand DNA Ligase buffer	12.5 μl	1×
5′ 末端アデニル化アダプター＊1、2	25 pmol	1 pmol/μl
Template	1～5 pmol	0.04～0.2 pmol/μl
Nuclease-Free Water	up to 25 μl	

＊1：アダプターのセルフライゲーションを防ぐために、アダプターの 3′ 末端にブロック修飾を推奨する（例：アミノ化）。
＊2：アダプターに合成オリゴを使用する場合、精製純度は HPLC もしくは PAGE を推奨する。
＊3：ATP 非依存的反応を用いることで、より短時間かつ高効率なライゲーションとなる。

● 参考文献
Miura, Fumihito *et al*. Identification of an enzyme with strong single-stranded DNA ligation activity and its application for sequencing. *Nucleic acids research*. (2025) **53**: 3.

v202505Da

タカラバイオ株式会社
ウェブサイト　https://www.takara-bio.co.jp

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel　077-565-6999
Fax　077-565-6995