

# T4 RNA Ligase

**Code No. 2050A**      **Size:**      **1,000 U**  
**Conc.:**      **40 U/μl**

## Supplied Reagents:

**10X T4 RNA Ligase Buffer**      **1 ml**  
**0.1% BSA**      **1 ml**

## Description:

T4 RNA Ligase catalyzes the formation of phosphodiester bonds between 5'-P oligonucleotides and 3'-OH oligonucleotides.<sup>1)</sup> This enzyme requires ATP as cofactor. The smallest substrates that can be ligated with this enzyme are pNp and NpNpNOH. The reaction rate (ligation efficiency) depends on the terminal sequence.<sup>1)</sup> In addition to ligation of RNA and RNA,<sup>2)</sup> it can also ligate DNA and RNA, although slowly.<sup>3)</sup> The ligation rate of DNA to DNA is extremely slow, as this ligase does not efficiently recognize double-stranded nucleic acids.

## Storage Buffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7.5  
50 mM NaCl  
1 mM DTT  
0.1 mM EDTA  
50% Glycerol

**Storage:**      -20°C

## Source:

*Escherichia coli* carrying the plasmid encoding T4 RNA ligase gene

**Unit definition:** One unit is the amount of the enzyme that incorporates 1 pmol of [5'-<sup>32</sup>P] pCp into acid-insoluble products in 10 minutes at 5°C, with oligo (A)<sub>n</sub> as the substrate. (Labeling reaction of 3' terminus of RNA)

## Reaction mixture for unit definition:

50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
3.3 mM DTT  
6 μM ATP  
0.001% bovine serum albumin  
10% DMSO  
1.2 μM 3'-OH RNA  
2.4 μM [5'-<sup>32</sup>P] pCp

## Quality Control Data:

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

## Applications:

- Labeling of 3'-OH termini of single-stranded RNA or DNA.<sup>4)</sup>  
When yeast tRNAPhe is used as the substrate in the reaction mixture, more than 80% of the 3'-termini can be labeled by incubation with 50 units of this enzyme for 16 hours at 5°C.<sup>4)</sup>
- Ligation of single-stranded oligo-RNA or DNA.<sup>2)</sup>

## Note:

- The optimal reaction temperature for intermolecular ligation is 5 - 16°C; at higher temperatures, the reaction is inhibited.
- The reaction is accelerated in the presence of PEG, without affecting reaction specificity.<sup>5)</sup>
- To increase ligation efficiency, use a high concentration of enzyme and a low concentration of ATP relative to the substrate concentration.

## Composition of Supplied Reagents (Store at -20°C):

- 10X T4 RNA Ligase Buffer  
500 mM Tris-HCl, pH 7.5  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM DTT  
10 mM ATP
- 0.1% BSA (final 0.006%)
  - The supplied buffer has the different composition from that used for unit definition. It is the general composition for ligation of short RNA fragments. For labeling 3'-OH termini of single-strand RNA or DNA, the buffer used for unit definition is preferable.
  - A white precipitate may be generated when adding 0.1% BSA directly to the supplied buffer. Prepare the reaction mixture (final conc. 0.006% BSA) by adding the reagents in the order given below.  
Sterile purified water → supplied buffer → 0.1% BSA → substrate RNA or DNA

## Application example: Ligation of single-stranded RNA or DNA

- Prepare the reaction mixture in a microtube by combining the following in a total volume of 50 μl.

Single-stranded RNA or DNA	1 - 2 μg
10X T4 RNA Ligase Buffer	5 μl
0.1% BSA	3 μl
T4 RNA Ligase	40 - 50 U
PEG 6000	final 25%
Sterile purified water	to 50 μl

- Incubate at 5 - 16°C for 16 - 18 hours.
- Stop the reaction by adding 2 μl of 0.5 M EDTA.

## References:

- Gumport R I and Uhlenbeck O C. *Gene Amplification and Analysis* (Chirikjian J G and Papas T S, eds.) (1982) **2**: 313-345, Elsevier, Amsterdam.
- Romaniuk P J and Uhlenbeck O C. *Methods in Enzymology*. (1983) **100**: 52-59.
- Brennan C A, Manthey A E, and Gumport R I. *Methods in Enzymology*. (1983) **100**: 38-52.
- England T E, Bruce A G, and Uhlenbeck O C. *Methods in Enzymology*. (1980) **65**: 65-74.
- Harrison B and Zimmerman S B. *Nucleic Acids Res.* (1984) **12**: 8235-8250.

## Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6973 or from our website at [www.takara-bio.com](http://www.takara-bio.com). Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements. All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

# T4 RNA Ligase

Code No. 2050A      容量： 1,000 U  
濃度： 40 U/ $\mu$ l

## 添付試薬：

10 × T4 RNA Ligase Buffer      1 ml  
0.1% BSA      1 ml

## ●製品説明

T4 RNA Ligase は 5'-P 末端のオリゴヌクレオチドと 3'-OH 末端のオリゴヌクレオチドを結合させる酵素である。<sup>1)</sup> 補酵素として ATP を要求する。分子内ライゲーションによる環化反応、分子間ライゲーションとも可能である。最小基質は、NpNpNOH (3'-OH オリゴマー、受容体)、pNp (5', 3' DP モノマー、供与体) である。<sup>1)</sup> ライゲーション効率は受容体、供与体それぞれの塩基に大きく影響される。RNA どうしのライゲーション<sup>2)</sup> に比べて、DNA-RNA、DNA どうしのライゲーションはかなり効率が悪い。<sup>3)</sup>

●形状      20 mM Tris-HCl (pH7.5)  
50 mM NaCl  
1 mM DTT  
0.1 mM EDTA  
50% グリセロール

●保存      - 20°C

## ●起源

*Escherichia coli* carrying the plasmid encoding T4 RNA ligase gene

## ●活性の定義

Oligo (A)<sub>n</sub> を基質として、5°C、10 分間に 1 pmol の [5'-<sup>32</sup>P] pCp を酸不溶性沈殿物に取り込む酵素活性を 1 U とする (RNA 3' 末端標識反応)。

## ●活性測定用反応液組成

50 mM HEPES-NaOH (pH7.5)  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
3.3 mM DTT  
6  $\mu$ M ATP  
0.001% ウシ血清アルブミン  
10% DMSO  
1.2  $\mu$ M 3'-OH RNA  
2.4  $\mu$ M [5'-<sup>32</sup>P]pCp

## ●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のドキュメントセンターからダウンロードできます。

## ●用途

- 一本鎖 RNA および一本鎖 DNA の 3'-OH 末端の標識  
yeast tRNAPhe を基質としたとき、上記反応液中で 50 U の本酵素を 5°C で 16 時間作用させると、80% 以上の tRNAPhe の 3' 末端が標識される。<sup>4)</sup>
- 一本鎖 oligo RNA、一本鎖 oligo DNA の連結

## ●使用上の注意

- 分子間ライゲーションの至適反応温度は 5 ~ 16°C で、それ以上では抑制される。
- PEG 共存下で反応は促進されるが、反応特異性に変化はない。<sup>5)</sup>
- ライゲーション反応の効率を上げるためには、酵素濃度は高く、ATP 濃度については基質濃度を考慮の上、できるだけ低くすることが望ましい。

## ●添付試薬組成 (保存: - 20°C)

- 10 × T4 RNA Ligase Buffer  
500 mM Tris-HCl (pH7.5)  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM DTT  
10 mM ATP
- 0.1% BSA (別添) 終濃度 0.006% で使用
  - このバッファー系は短鎖の RNA 断片同士をライゲーションする実験でより一般的な組成となっており、活性測定系とは異なっている。
  - 3' 末端の標識反応には、活性測定系の組成を推奨する。
  - 10 × Buffer に 0.1% BSA 溶液を直接加えると多量の白沈が生じるので、反応液を調製する際は次の順番で試薬を加える。  
滅菌精製水 → 10 × 添付 Buffer → 0.1% BSA → 基質 RNA or DNA

## ●使用例 一本鎖 DNA、RNA のライゲーション反応

- マイクロチューブ内で以下の反応液を調製し、全量を 50  $\mu$ l とする。

Single-stranded RNA or DNA	1 ~ 2 $\mu$ g
10 × T4 RNA Ligase Buffer	5 $\mu$ l
0.1% BSA	3 $\mu$ l
T4 RNA Ligase	40 ~ 50 U
PEG 6000	final 25%
滅菌精製水	to 50 $\mu$ l

- 5 ~ 16°C で 16 ~ 18 時間反応を行う。
- 0.5 M EDTA を 2  $\mu$ l 加えて反応を停止させる。

## ●参考文献

- Gumport R I and Uhlenbeck O C. *Gene Amplification and Analysis* (Chirikjian J G and Papas T S, eds.) (1982) **2**: 313-345, Elsevier, Amsterdam.
- Romaniuk P J and Uhlenbeck O C. *Methods in Enzymology*. (1983) **100**: 52-59.
- Brennan C A, Manthey A E, and Gumport R I. *Methods in Enzymology*. (1983) **100**: 38-52.
- England T E, Bruce A G, and Uhlenbeck O C. *Methods in Enzymology*. (1980) **65**: 65-74.
- Harrison B and Zimmerman S B. *Nucleic Acids Res.* (1984) **12**: 8235-8250.

## ●注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。  
タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。  
ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。  
本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。