

产品组分

组分名称	组分目录号	浓度	规格 30,000 U
T4 Polynucleotide Kinase	RM20514	10,000 U/mL	3 mL

产品说明

T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK)催化 ATP γ 位的磷酸基团和多聚核苷酸的 5'-羟基 (dsDNA / ss DNA 或 RNA) 以及 3'-单磷酸核苷间进行转移和交换。T4 PNK 还具有 3' 磷酸酶活性, 将 3'-磷酸基团从寡核苷酸的 3' 磷酸末端、脱氧 3'-单磷酸核苷和脱氧 3'-二磷酸核苷上水解掉。

产品应用

- DNA 或 RNA 5' 末端的磷酸化, 用于连接反应。
- DNA 或 RNA 的末端标记, 用作探针和进行 DNA 测序。
- 除去 3' 磷酸基团。

保存温度

-20°C

产品来源

T4 Polynucleotide Kinase 基因在大肠杆菌中诱导重组表达并经过分离纯化得到。

活性定义

1 活性单位 (U) 指在 37°C 反应 30 min, 催化 20 pmol 荧光标记寡核苷酸磷酸化所需的酶量。

反应条件

1X T4 PNK Reaction Buffer, 37°C 反应

1X T4 PNK Reaction Buffer 组成

70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 7.6 @ 25°C

酶储存液

10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, 0.1 μ M ATP, pH 7.4 @ 25°C

热失活

65°C 加热 20 min

操作说明

使用T4 PNK进行放射性磷酸化标记

1、在冰上操作, 按下表加入各反应试剂:

组分	使用量
ddH ₂ O	Up to 50 μ L
10X T4 PNK Reaction Buffer	5 μ L
DNA	Up to 50 pmol of 5' termini
[γ - ³² P] ATP (10 mM)	0.25 μ L (50 pM)
T4 PNK	2 μ L (20 U)

2、将上述体系充分混匀后, 置于 37°C 反应 30 min。

3、反应完成后, 65°C 加热 20 min 使 T4 PNK 酶失活。

注: [γ -³²P]ATP 可以用 [γ -³³P]ATP 替换, 但本产品不提供放射性标记的 ATP。

使用T4 PNK进行非放射性磷酸化

1、在冰上操作, 按下表加入各反应试剂:

组分	使用量
ddH ₂ O	Up to 50 μ L
10X T4 PNK Reaction Buffer	5 μ L
DNA	Up to 300 pmol of 5' termini
ATP (10 mM)	5 μ L
T4 PNK	1 μ L (10 U)

2、将上述体系充分混匀后, 置于 37°C 反应 30 min。

3、反应完成后, 65°C 加热 20 min 使 T4 PNK 酶失活。

注: 本产品中不单独提供 ATP; 1X T4 DNA Ligase Buffer 含有 1 mM ATP, 该 Buffer 可以应用于非放射性磷酸化且不需要补加 ATP (T4 PNK 在 1X T4 DNA Ligase Buffer 中具有 100% 的酶活性)。

使用T4 PNK进行末端标记

T4 PNK 能对 5' 突出末端进行放射性标记, 或使用 Klenow 片段掺入只含一种 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ 标记的 dNTPs 补平(加入反应的 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dNTPs 取决于 DNA 延伸的末端序列, 例如用 EcoRI 切割 DNA 所产生的末端用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP 标记。)

1、在冰上操作, 按下表加入各反应试剂:

组分	使用量
ddH ₂ O	Up to 20 μL
10X T4 PNK Reaction Buffer	2 μL
DNA Ladder	1 or 2 μL (1 μg)
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP ((3,000 Ci/mM, 5 mCi/mL)	1 μL
T4 PNK	1 μL (10 U)

2、将上述体系充分混匀后, 置于 37°C 反应 30 min。

3、将上述完成标记的样品在 1X TBE Buffer, 4-20%的丙烯酰胺凝胶(10 cm X 10 cm)中, 100 V 电泳 50-60 min。曝光 20 min 后发出非常强的可读信号, 该信号强度约是 100 μM ADP 的两倍。

注意事项

1、T4 PNK 进行 5'末端磷酸化时, 5'-OH 的末端标记效率最高; 如果末端是 5'-P, 可以通过 Alkaline phosphatase 对 5'末端去磷酸化。

2、虽然利用交换反应可以避免末端标记前的去磷酸化, 但末端标记活性较低。

3、增加 ATP 浓度能实现 Gaps 磷酸化, 但不能使 Nicks 有效磷酸化。CTP、GTP、TTP、UTP、dATP 或 dTTP 均可替代 ATP 作为磷酸基团供体。

4、酶切得到的 DNA 片段需经乙醇沉淀等方法纯化。

5、当用于交换反应的 DNA 在 5 pmol 以上(约 1,000 bp 以上)时, 标记效率有时会低于 106 cpm/pmol。

6、如果交换反应所用 DNA 低于 500 bp, 标记效率有时会有所降低。

7、磷酸化反应时的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 可用 $[\gamma\text{-}^{35}\text{S}]$ ATP 替代。

8、要提高 5'平末端或 5'凹陷末端的磷酸化效率, 可在加 T4 PNK 前, 先将 DNA 溶液于 70°C 加热 5 min, 然后冰上冷却, 或者加入 5%(w/v)的 PEG-8,000。

8、当反应体系中含有以下物质时, 对酶有不同程度的抑制效应:

抑制物	抑制效率(%)
50 mM NaCl	0
100 mM NaCl	30
150 mM NaCl	50
7 mM 磷酸盐	50
7 mM 硫酸铵	75

9、由于 T4 PNK 酶活性可被铵离子所抑制, 所以磷酸化步骤前, DNA 不要在含铵离子的溶液中沉淀。可以用交换反应的方法省略末端标记反应前的去磷酸化反应, 尽管这样可能会降低标记的特异性。在反应缓冲液中加入终浓度为 100 μM 的 ADP 可以达到足够的掺入量。