

T4 Polynucleotide Kinase

T4 多聚核苷酸激酶 (T4 PNK)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: LK101

保存: 在-18℃及其以下温度下保存两年。

浓度: 10000 units/ml

产品说明

本产品由重组T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK) 基因在大肠杆菌中经诱导表达、纯化而成, 分子量大小约为34.6 kDa。T4 PNK是一种多聚核苷酸5'羟基激酶, 可以催化ATP的 γ 位磷酸基团向单链或双链DNA、RNA、寡核苷酸或带有3'磷酸基团的单核苷酸的5'羟基转移。T4 Polynucleotide Kinase还具有3'磷酸酶活性, 可催化3'磷酸化的多聚核苷酸的去磷酸化。

适用范围

- 寡核苷酸、DNA或RNA的5'末端标记, 用作Southern、Northern、EMSA等的探针、DNA测序引物、PCR引物等;
- 寡核苷酸、DNA 或 RNA 5' 末端的磷酸化;
- 去除3'端磷酸基团。

产品组成

Component	LK101-01	LK101-02	LK101-03
T4 Polynucleotide Kinase	500 units	4×500 units	10000 units
10×T4 PNK Reaction Buffer	0.25 ml	1 ml	5 ml
ATP(10 mM)	0.25 ml	1 ml	5 ml
10×DNA Loading Buffer	1 ml	1 ml	5 ml

活性定义

37℃, 30分钟内, 将转移ATP上1 nmol γ -磷酸基团转移到DNA 5'-OH末端所需的酶量定义为1个活性单位 (U)。

质量控制

核酸内切酶活性: 在50 μ l 反应体系中, 100 U酶与1 μ g质粒经37℃孵育4小时, RFI型转变为RFII型的比例小于10%。

核酸外切酶活性: 在50 μ l 反应体系中, 100 U酶与1 μ g 线性双链DNA片段经37℃孵育4小时, 电泳检测DNA无降解。

非特异性DNase活性: 在50 μ l反应体系中, 100 U酶与1 μ g Lambda DNA 经37℃孵育16小时, 琼脂糖电泳检测DNA无降解。

RNase活性: 10 μ l反应体系中, 10 U酶与80 ng RNA经37℃孵育16小时, 电泳检测RNA残留量大于90%。

酶贮存缓冲液

20 mM Tris-HCl pH7.5, 25 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, 50% Glycerol

10× Reaction Buffer

500 mM Tris-HCl pH7.6, 100 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT, 1 mM Spermidine

失活或抑制

75℃加热10分钟可使T4 Polynucleotide Kinase失活, 加入EDTA也可使T4 Polynucleotide Kinase失活。金属离子螯合剂、磷酸盐、铵根离子、大于50 mM的KCl和NaCl, 会抑制T4 Polynucleotide Kinase的活性。



放射性5' 磷酸化标记反应

1、反应体系 (以20 μ l体系为例)

Component	Volume
Dephosphorylated DNA or Oligonucleotide	1-20 pmol of 5'-termini/10-50 pmol
10 $\times$ T4 PNK Reaction Buffer	2 μ l
[γ - 32 P or γ - 33 P]-ATP	20 pmol
T4 Polynucleotide Kinase	1 μ l (10 units)
Nuclease-free Water	up to 20 μ l

2、反应条件

37 $^{\circ}$ C孵育30分钟；75 $^{\circ}$ C加热10分钟终止反应。

5' 磷酸化反应

1、反应体系 (以20 μ l体系为例)

Component	Volume
Linear dsDNA or Oligonucleotide	1-20 pmol of 5'-termini/10-50 pmol
10 $\times$ T4 PNK Reaction Buffer	2 μ l
ATP (10 mM)	2 μ l
T4 Polynucleotide Kinase	1 μ l (10 units)
Nuclease-free Water	Variable
Total volume	20 μ l

2、反应条件

37 $^{\circ}$ C孵育30分钟；75 $^{\circ}$ C加热10分钟可终止反应。

注意事项

- 金属离子螯合剂、磷酸盐、铵根离子、大于50 mM的KCl和NaCl，会抑制T4 Polynucleotide Kinase的酶活性，请确保DNA的纯度。
- CTP、GTP、TTP、UTP、dATP 及 dTTP 均可替代 ATP 作为磷酸供体。
- PEG和Spermidine可提高磷酸化反应的效率。要提高5'平末端或 5'凹陷末端的磷酸化效率，可在加T4 Polynucleotide Kinase前，先将DNA溶液于70 $^{\circ}$ C加热 5 分钟，然后冰上冷却，或者加入 5% (w/v) 的PEG 8000。
- T4 Polynucleotide Kinase在新鲜缓冲液中表现最适酶活力，旧缓冲液中酶活力由于部分DTT被氧化会降低。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202208

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

