

T4 Polynucleotide Kinase

产品编号	产品名称	包装
D7096	T4 Polynucleotide Kinase	100U

产品简介:

- T4 Polynucleotide Kinase, 简称T4 PNK, 中文名称T4多聚核苷酸激酶, 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。其他NTP也可产生相同的反应: $5\text{'-OH} + \text{NTP} \rightarrow 5\text{'-P} + \text{NDP}$
- 上述的磷酸化反应是可逆的。当缺失ATP并且存在ADP的情况下, T4 Polynucleotide Kinase可以显示出5'磷酸酯酶的活性, 催化单链或双链DNA、RNA、寡核苷酸或带有3'磷酸基团的单核苷酸的5'磷酸基团向ADP的转移形成ATP。其他NTP也可产生相同的反应: $5\text{'-P} + \text{NDP} \rightarrow 5\text{'-OH} + \text{NTP}$ (最适pH为6.4左右)
- 当ATP和ADP都适量存在时, T4 Polynucleotide Kinase可以催化单链或双链DNA、RNA、寡核苷酸或带有3'磷酸基团的单核苷酸的5'磷酸基团和ATP的 γ 位磷酸基团之间的交换反应。其他NTP也可产生相同的反应: $5\text{'-P} + \text{NTP} + \text{NDP} \rightarrow 5\text{'-P} + \text{NDP} + \text{NTP}$
- T4 Polynucleotide Kinase同时具有3'磷酸酯酶活性, 可催化3'磷酸化的多聚核苷酸的去磷酸化: $3\text{'-P} \rightarrow 3\text{'-OH} + \text{Pi}$ (最适pH为5.9左右)
- T4 Polynucleotide Kinase的激酶活性在C-末端附近, 而磷酸酯酶活性在N-末端附近。
- **用途:** 寡核苷酸、DNA或RNA的5'末端标记, 用作Southern、Northern、EMSA等的探针, 凝胶电泳的marker, DNA测序引物, PCR引物等; 使寡核苷酸、DNA或RNA的5'端磷酸化, 确保后续连接反应顺利进行; 催化3'磷酸化的单核苷酸的5'磷酸化, 使该单核苷酸可以和DNA或RNA的3'末端连接; 去除3'端磷酸基团。
- **来源:** 由大肠杆菌表达, 表达基因的来源为T4嗜菌体。
- **活性定义:** 37°C 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。
- **酶活性检测条件:** 100mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM MgCl₂, 5mM DTT, 0.5mM 5'-OH DNA, 0.05mM ATP, 0.1MBq/ml [γ -³³P]-ATP。
- **纯度:** 不含DNA内切酶和外切酶, 不含RNA酶。
- **酶储存溶液:** 20mM Tris-HCl (pH7.5), 25mM KCl, 0.1mM EDTA, 2mM DTT, 50% glycerol。
- **Reaction Buffer A (10X)** (用于磷酸化反应): 500mM Tris-HCl (pH7.6 at 25°C), 100mM MgCl₂, 50mM DTT, 1mM spermidine, 1mM EDTA。
- **Reaction Buffer B (10X)** (用于交换反应): 500mM imidazole-HCl (pH6.4 at 25°C), 0.18M MgCl₂, 50mM DTT, 1mM spermidine, 1mM EDTA, 1mM ADP。
- **缓冲液兼容性:** 在碧云天的内切酶反应缓冲液1X G、1X O、1X Y、2X Y中的活性为100%, 在1X B、1X R中的活性为75-100%; 在碧云天的Taq、Pfu DNA polymerase和M-MuLV反应缓冲液中的活性为50-100%。
- **失活或抑制:** 75°C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50mM的KCl和NaCl均可显著抑制T4 Polynucleotide Kinase的活性。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7096-1	T4 Polynucleotide Kinase (10U/ μ l)	100U
D7096-2	Reaction Buffer A (10X)	80 μ l
D7096-3	Reaction Buffer B (10X)	40 μ l
D7096-4	24% PEG Solution	40 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存。

注意事项:

- 铵盐沉淀获得的DNA不能用于T4 Polynucleotide Kinase的标记反应。铵盐可强烈抑制T4 Polynucleotide Kinase的酶活性。
- PEG可促进磷酸化反应速率和效率; 交换反应体系应加入PEG。
- 酶使用时宜存放在冰盒内或冰浴上, 使用完毕后宜立即放置于-20°C保存。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。

➤ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. DNA 5' 末端标记：

a. 参考如下表格设置反应体系：

Reagent	Volume
待磷酸化DNA	1~20pmol (5' 末端)
Reaction Buffer A (10X)	2μl
[γ - ³² P or γ - ³³ P]-ATP (3,000Ci/mmol)	20pmol
补充无核酸酶的去离子水	至19μl
T4 Polynucleotide Kinase (10U/μl)	1μl

b. 按上表设置好反应体系后，轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体。

c. 37°C 孵育 30 分钟。

d. 加入 1μl 0.5M EDTA (pH 8.0)混匀，以终止反应。

e. 后续可以使用酚氯仿抽提、乙醇沉淀等方法纯化标记的DNA，也可以使用适当的DNA纯化试剂盒进行纯化。DNA纯化试剂(D0033)可以向碧云天订购。

2. DNA 5' 末端磷酸化：

a. 参考如下表格设置反应体系：

Reagent	Volume
待磷酸化DNA	1~20pmol (5' 末端)
Reaction Buffer A (10X)	2μl
0.1mM ATP	1μl
补充无核酸酶的去离子水	至19μl
T4 Polynucleotide Kinase (10U/μl)	1μl

b. 按上表设置好反应体系后，轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体。

c. 37°C 孵育 30 分钟。

d. 加入 1μl 0.5M EDTA (pH 8.0)混匀，以终止反应。

e. 后续可以使用酚氯仿抽提、乙醇沉淀等方法纯化标记的DNA，也可以使用适当的DNA纯化试剂盒进行纯化。DNA纯化试剂(D0033)可以向碧云天订购。

3. 通过交换反应(exchange reaction)进行DNA 5' 末端标记：

a. 参考如下表格设置反应体系：

Reagent	Volume
待磷酸化DNA	1~20pmol (5' 末端)
Reaction Buffer B (10X)	2μl
[γ - ³² P or γ - ³³ P]-ATP (3,000Ci/mmol)	40pmol
24% PEG Solution	4μl
补充无核酸酶的去离子水	至19μl
T4 Polynucleotide Kinase (10U/μl)	1μl

b. 按上表设置好反应体系后，轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体。

c. 37°C 孵育 30 分钟。

d. 加入 1μl 0.5M EDTA (pH 8.0)混匀，以终止反应。

e. 后续可以使用酚氯仿抽提、乙醇沉淀等方法纯化标记的DNA，也可以使用适当的DNA纯化试剂盒进行纯化。DNA纯化试剂(D0033)可以向碧云天订购。

4. 其它用途可以参考上述用途或相关文献资料进行。

使用本产品的文献：

1. Wang SM, Li M, Wu WS, Sun LL, Yan D. The role of transcription factor Sp1 in the regulation of gamma-glutamyl hydrolase gene expression by the rs3758149 polymorphism in CEM/C1 cells. *Pharmazie*. 2019 Nov 1;74(11):671-674.
2. Yuhe Kan, Zhaoyang Jin, Yongqi Ke, Dao Lin, Liang Yan, Li Wu, Yujian He. Replicative bypass studies of l-deoxyribonucleosides in Vitro and in E. coli cell. *Sci Rep*. 2022 Dec 7;12(1):21183.

Version 2023.12.05