

T4 Polynucleotide Kinase

项目号: T665879

保存条件: -20°C

产品内容

Component	T665879-500U	T665879-2500U
T4 Polynucleotide Kinase (10U/μl)	50 μl	250 μl
10×T4 PNK Reaction Buffer	150 μl	800 μl

产品简介

T4 Polynucleotide Kinase 简称 T4PNK, 中文名称 T4 多聚核苷酸激酶, 是由大肠杆菌表达, 表达基因的来源为 T4 嗜菌体, 可以催化磷酸在 ATP 的 γ -位和寡核苷酸链 (双链或单链 DNA 或 RNA) 的 5'-羟基末端以及 3'-单磷酸核苷间进行转移和交换, 同时还具有 3' 磷酸酶活性, 能将 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。该 T4 多聚核苷酸激酶可用于寡核苷酸、DNA 或 RNA 的 5' 末端标记或磷酸化; 催化 3' 磷酸化的单核苷酸 5' 磷酸化以及去除 3' 端磷酸基团等。本品于 75°C 加热 10 分钟可使其失活, 加入 EDTA 也可使其失活, 金属离子螯合剂、磷酸盐、铵根离子、大于 50mM 的 KCl 和 NaCl 均可显著抑制其活性。

活性定义

37°C 条件下, 30 分钟内, 将转移 ATP 上 1nmol 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。

质量控制

经过多次柱纯化, SDS-PAGE 检测其纯度大于 99%; 经检测无核酸内、外切酶、磷酸酶和 RNA 酶活性的污染。

使用方法

DNA 5' 末端磷酸化

1. 参考如下表格设置反应体系

试剂	50 μl 反应体系
待磷酸化 DNA	1-20 pmol (5' 末端)
10×T4 PNK Reaction Buffer	2 μl
0.1mM ATP	1 μl
T4 Polynucleotide Kinase (10U/μl)	1 μl
ddH ₂ O	up to 20 μl

2. 按上表设置好反应体系后, 轻轻混匀后离心沉淀液体。

置于 37°C 孵育 30 分钟。

加入 1 μl 0.5M/pH8.0 的 EDTA 以终止反应。

DNA 5' 末端标记

参考如下表格设置反应体系

试剂	50 μl 反应体系
待磷酸化 DNA	1-20 pmol (5' 末端)
10×T4 PNK Reaction Buffer	2 μl
[γ - ³² P or γ - ³³ P]-ATP (3,000Ci/mmol)	20 pmol
T4 Polynucleotide Kinase (10U/μl)	1 μl
ddH ₂ O	up to 20 μl

按上表设置好反应体系后, 轻轻混匀后离心沉淀液体。

置于 37°C 孵育 30 分钟。

加入 $1 \mu\text{l}$ $0.5\text{M}/\text{pH}8.0$ 的 EDTA 以终止反应。其他用途请自行参考相关文献资料进行。

注意事项

1. 由于铵盐可强烈抑制 T4 Polynucleotide Kinase 的活性，因此铵盐沉淀所得的 DNA 不能用于 T4 Polynucleotide Kinase 的标记反应。
2. PEG 可促进磷酸化反应速率和效率，交换反应体系应加入 PEG。
3. 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。