

T4 Polynucleotide Kinase

产品组分

组分	BM0201S 500U	BM0201L 10000U
T4 Polynucleotide Kinase (10U/ μ L)	50 μ L	1 mL
10×PNK Buffer	200 μ L	1 mL x 2

保存条件: -20°C 保存, 避免反复冻融。

产品概述: T4 Polynucleotide Kinase 简称 T4 PNK, 即 T4 多聚核苷酸激酶, 是一种多功能酶, 具有以下主要活性:

- 5'羟基激酶活性:** 催化 ATP 的 γ -位磷酸基团转移至单链或双链 DNA、RNA、寡核苷酸或带有 3'磷酸基团单核苷酸的 5'羟基末端。该反应是进行末端标记和连接前磷酸化的基础。反应式: 5'-OH + NTP \rightarrow 5'-P + NDP。
- 5'磷酸酯酶活性:** 在缺失 ATP 但存在 ADP 的条件下 (最适 pH ~6.4), 催化上述反应的逆反应, 将 5'磷酸基团转移 ADP 生成 ATP。反应式: 5'-P + NDP \rightarrow 5'-OH + NTP。
- 磷酸交换反应:** 当 ATP 和 ADP 共存时, 可催化 5'磷酸基团与 NTP 的 γ -位磷酸基团之间的交换。
- 3'磷酸酯酶活性:** 3'磷酸化多聚核苷酸的去磷酸化反应 (最适 pH ~5.9), 生成 3'羟基末端。反应式: 3'-P \rightarrow 3'-OH + Pi。

产品用途:

- 对 DNA 或 RNA 进行 5'磷酸化, 以便进行连接反应和测序文库的制备, 是高通量测序 (NGS) 文库制备过程中的关键酶。
- DNA 或 RNA 的末端标记, 用作探针末端标记, 或用于测序前对末端进行修饰。
- 去除 3' 磷酸基团。

来源: 由携带 T4 多聚核苷酸激酶基因的大肠杆菌菌株表达并纯化得到。

纯度: SDS-PAGE 纯度大于 98%。不含 DNase 和 RNase。

酶储存液: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 μ M ATP, 50% glycerol, pH 7.4 @ 25°C。

10×T4 PNK Buffer: 700 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, pH 7.6 @ 25°C。

活性单位定义: 1 单位即 1 Richardson 单位, 指在 50 μ L 总反应体系, 含有 66 μ M[γ -³²P]ATP (5×10^6 cpm/ μ mol) 和 0.26 mM 5'羟基末端鲑鱼精子 DNA 的 1×T4 多聚核苷酸激酶反应缓冲液中, 37°C 条件下, 30 分钟内催化 1 nmol [³²P]掺入酸不溶物所需的酶量。

失活或抑制剂: 75°C 加热 10 min 或 65°C 加热 20 min 或可使 T4 PNK 失活。金属离子螯合剂 (如 EDTA)、磷酸盐、铵离子以及高浓度的盐 (如>50 mM 的 KCl 或 NaCl) 会显著抑制 T4 PNK 活性。特别注意: 经铵盐沉淀法获得的 DNA 不适用于 T4 PNK 标记反应, 因残留的铵盐是强效抑制剂。

使用示例

1 放射性标记磷酸化反应体系 (50 μ L)

1.1 按下表配制

组分	用量
DNA	最多 50 pmole
10×T4 PNK Buffer	5 μ L
放射性标记 ATP	50 pmole 的 [γ - ³² P] ATP
T4 PNK (10 U/ μ L)	1 μ L
补灭菌水	50 μ L

1.2 37°C 孵育 30 分钟。

1.3 65°C 加热 20 分钟灭活 T4 PNK。

注意事项:

- 提供的 10×T4 PNK Buffer 不含 ATP, 进行反应时需额外加入 ATP。1×T4 DNA 连接酶缓冲液 (含 1 mM ATP) 可替代本产品的 1×反应缓冲液用于非放射性磷酸化, 且 T4 PNK 在此条件下活性为 100%。
- CTP、GTP、TTP、UTP、dATP 及 dTTP 均可以替代 ATP 作为磷酸供体。
- 使用时请将酶置于冰上, 使用完毕后宜立即放置于-20°C 保存。
- 本产品仅供专业研究人员进行科学研究使用, 不可用于临床诊断、治疗、食品、药品或任何其他非科研用途, 且必须按规定存放于专业实验场所。

2. 使用 T4 PNK 进行常规磷酸化标记

2.1 按下表配制

组分	用量
DNA	最多 300 pmole
10×T4 PNK Buffer	5 μ L
ATP (10mM)	5 μ L
T4 PNK (10 U/ μ L)	1 μ L
补灭菌水	50 μ L

2.2 37°C 孵育 30 分钟。

2.3 65°C 加热 20 分钟灭活 T4 PNK。