

T4 Polynucleotide Kinase

REF: EG25201S

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl)	50 μl
10× T4 PNK Buffer	1 ml

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，能够催化 ATP 的 γ-磷酸基团转移到寡核苷酸链（双链或单链 DNA 或者 RNA）或 3'-单磷酸核苷上的 5'-羟基末端，且该反应过程可逆。此外，T4 PNK 还具有 3' 磷酸酶活性，可以将 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。

活性定义

1 活性单位 (U) 定义为在 1× T4 PNK Buffer 中，37°C、30 min 内使 1 nmol 的 [γ-³²P] ATP 掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量。

产品应用

1. 对 DNA 或 RNA 5' 末端进行磷酸化，以便进行连接反应。
2. DNA 或 RNA 的末端标记，用作探针和进行 DNA 测序。
3. 除去 3' 磷酸基团。

质量控制

蛋白纯度

经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测，蛋白纯度不低于 95%。

非特异性内切酶活性

37°C 下，在 20 μl 反应体系中将 10 U T4 Polynucleotide Kinase 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，少于 20% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

DNase 活性

37°C 下，在 20 μl 反应体系中将 10 U T4 Polynucleotide Kinase 与 15 ng 双链 DNA 片段共同温育 16 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，双链 DNA 片段无变化。

RNase 活性

37°C 下，在 10 μl 反应体系中将 10 U T4 Polynucleotide Kinase 与 500 ng RNA 共同温育 1 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，超过 90% 的 RNA 保持完整。

宿主 DNA 残留

采用中国药典 2020 版四部通则 3407 外源性 DNA 残留量测定法第三法定量 PCR 法，本品中大肠杆菌宿主细胞 DNA 残留量低于 1 拷贝 /10 U。

使用方法

1. DNA 5' 末端磷酸化:

试剂	使用量
底物	1~300 pmol (5' 末端)
10× T4 PNK Buffer ^a	5 μl
T4 Polynucleotide Kinase	1 μl
ATP (10 mM)	5 μl
ddH ₂ O	Up to 50 μl

a. 10× T4 PNK Buffer 不含 ATP，需自行准备。

- ① 将上述体系充分混匀后，37°C 温育 30 min；
- ② 反应完成后，75°C 温育 10 min 使 T4 Polynucleotide Kinase 失活。

2. DNA 5' 末端标记:

试剂	使用量
底物	1~50 pmol (5' 末端)
10× T4 PNK Buffer ^b	5 μl
T4 Polynucleotide Kinase	2 μl
[γ- ³² P]ATP (10 mM)	0.25 μl
ddH ₂ O	Up to 50 μl

b. 10× T4 PNK Buffer 不含放射性标记的 ATP，需自行准备。

- ① 将上述体系充分混匀后，37°C 温育 30 min；
- ② 反应完成后，75°C 温育 10 min 使 T4 Polynucleotide Kinase 失活。

注意事项

1. 金属离子螯合剂、磷酸盐、铵根离子、大于 50 mM 的 KCl 和 NaCl 均可显著抑制 T4 Polynucleotide Kinase 的活性。
2. 聚乙二醇 (PEG) 和亚精胺可改善磷酸化反应的速率和效率。
3. 提高 ATP 的浓度可让缺口磷酸化。切刻位点不能有效地磷酸化。CTP、GTP、TTP、UTP、dATP 及 dTTP 均可以替代 ATP 作为磷酸供体。
4. T4 Polynucleotide Kinase 使用时宜置于冰上，使用完毕后立即放置于 -20°C 保存。