

# ExCell Bio

## T4 Polynucleotide Kinase

### User Manual

Catalog Number MB000-5401

MB000-5402

MB000-5403

MB000-5404



## 产品概述

本酶能够催化将 ATP 上的  $\gamma$  磷酸基团转移到双链或单链 DNA 的 5'末端；该酶同时还具有 3'磷酸酶活性，将接头、引物、探针或其他单链或双链 DNA 的 3'端磷酸基团去除。

含有 T4 Polynucleotide Kinase 基因的重组表达载体,经 E.coli 重组表达纯化制成，分子量 37.14KDa ,N 端含有 10 个 His 标签。

## 技术参数

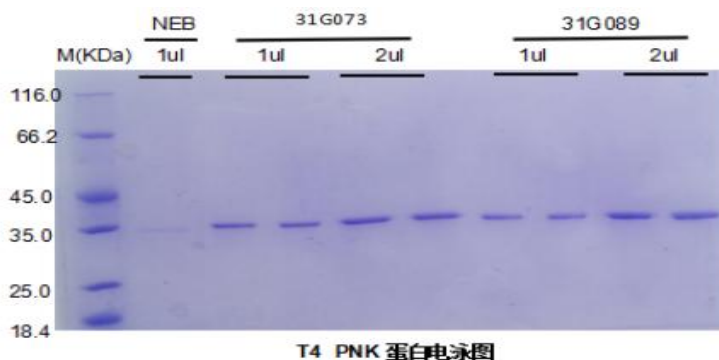
酶储存溶液	10 mM Tris-HCl(pH7.4 @ 25°C), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 $\mu$ MATP, 50%Glycerol.
10x 酶反应液	700 mM Tris-HCl(pH7.6 @ 25°C), 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT.
纯度	经过 SDS-PAGE 电泳和考马氏亮蓝染色, 灰度扫描分析, 纯度大于 98%。
核酸内切酶活性	200 U 的本酶和 1 $\mu$ g 的 $\Phi$ X174 DNA 在 37°C 下反应 4 小时, 小于 10% 的 RFI 型转变为 RFII 型。
核酸外切酶活性	30 U 的本酶和 1 $\mu$ g $\lambda$ DNA-Hind III 在 37°C 下反应 4 小时, DNA 的电泳谱没有发生涂抹和条带降解现象。
RNase 酶残留	100U 的本酶和 2 $\mu$ g 16S,23S rRNA 在 37°C 下反应 1 小时, RNA 的电泳谱带不发生变化。
大肠杆菌基因组残留	采用 QPCR 方法, E.coli 基因组 DNA (gDNA) 做系列稀释, 做标准曲线, 采用 16SrRNA 保守序列设计引物扩增, 得出 1 $\mu$ l 酶液中含有的大肠杆菌基因组残留拷贝数小于 1 个拷贝。
活性单位浓度	10,000 U/ml

## 活性分析

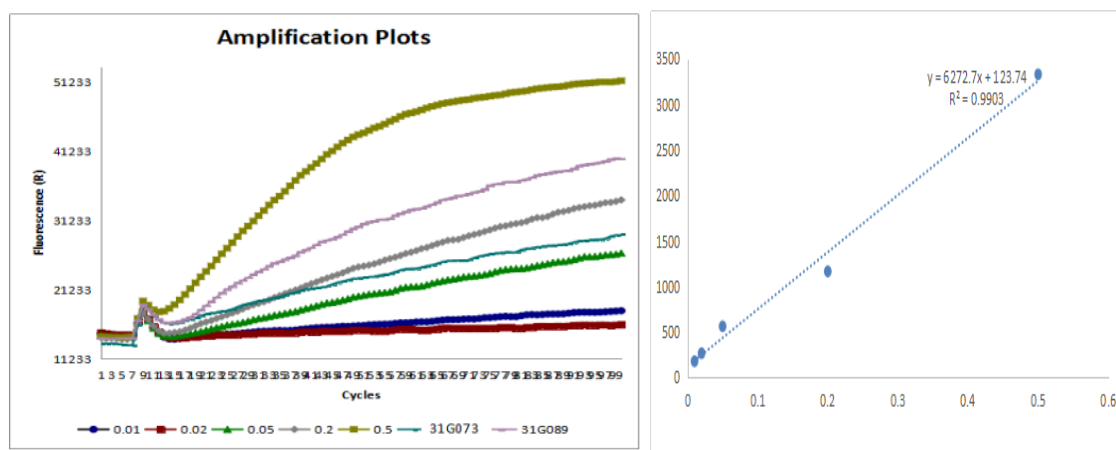
一个活性单位即一个 Richardson 单位，是在该酶的反应缓冲液中，含有 66 $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (5x10<sup>6</sup>cpm/ $\mu$ M), 0.26mM 的含有 5'羟基末端鲑鱼精 DNA, 37 度时 30 分钟内催化 1nmol [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 渗入到酸不溶性沉淀物中所需要的酶量为一个活性单位。

## 相关数据

### 1. SDS-PAGE 电泳图谱



## 2. T4 Pnk 活力测定



采用分子信标方法，将国外著名品牌公司的 T4 Pnk 做系列稀释，在反应体系中加入 0.01-0.5 U 的酶，在反应的起始阶段其荧光增量与酶量呈现出线性关系，本公司生产的酶与国外著名品牌公司的酶比活力相当。

## 产品应用

DNA 或 RNA 的 5'末端放射性标记，以制备探针；

寡聚核苷酸的 5'末端进行磷酸化，以方便进行连接反应；

除去寡聚核苷酸的 3'末端的磷酸基团。

## 产品规格

	货号	规格
1	MB000-5401	250 U
2	MB000-5402	500 U

3	MB000-5403	2,500 U
4	MB000-5404	10,000 U

## 产品组分及储存条件

货号	规格	组分	
		T4 Polynucleotide Kinase	10xT4 Pnk Reaction Buffer
MB000-5401	250 U	1 管	0.5 mlx1 管
MB000-5402	500 U	1 管	0.5 mlx1 管
MB000-5403	2,500 U	1 管	1.0 mlx1 管
MB000-5404	10,000 U	1 管	1.0mlx 1 管

-20°C条件下运输和保存。

## 实验流程

1.使用 PCR 反应液直接进行 DNA 片段的 5'末端磷酸化反应

T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl)	2 μl
ATP (10 mM)	5μl
10x T4 Pnk Reaction Buffer	2 μl
PCR 反应液	≤5 μl
ddH <sub>2</sub> O	up to 20 μl

2.使用纯化后的双链进行 DNA 片段的 5'末端磷酸化反应

T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl)	2μl
ATP (10 mM)	5μl
10x T4 Pnk Reaction Buffer	2μl
双链 DNA 片段	≤10pmol
ddH <sub>2</sub> O	up to 20μl

3.使用 Primer、Linker、  
末端磷酸化反应

Adaptor、Probe 的 5'

T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl)	1 μl
ATP (10 mM)	1μl
10x T4 Pnk Reaction Buffer	1μl
单链 DNA 片段	5-10pmol
ddH <sub>2</sub> O	up to 10μl

以上三种反应体系，均为 37℃ 反应 30 分钟，再 70℃ 加热 10 分钟，低温离心取上清用于其它实验。

### 注意事项

1. 7mM 的磷酸、焦磷酸盐或 0.15M 氯化钠能够抑制该酶 50% 的活性，7mM 的硫酸铵抑制该酶 75% 的活性。

2. 反应需要 Mg<sup>2+</sup> 和 SH 试剂如 DTT 的参与，DTT 氧化减少会导致该酶活性的降低。

3. 可使用含有 T4 DNA Ligase 反应液代替 T4 Pnk 反应液，37℃ 反应 30 分钟后，不加热，直接进行连接。

4. 为提高 5' 突出或凹陷端的磷酸化效率，可在加入 T4 Pnk 前，将 DNA 于 70℃ 加热 5 分钟，并上冷却，再加入终浓度 5% (W/V) 的 PEG-6000。

5. 65℃ 加热 20 分钟 或 70℃ 加热 10 分钟可以失活。