产品说明

T4 多聚核苷酸激酶能够催化 ATP 的 γ -位磷酸基团转移到寡核苷酸链（双链或单链 DNA 或 RNA）的 5'-羟基末端以及 3'-单磷酸核苷上。**本酶为修饰后的 T4PNK，具有所有激酶的活性，但是缺失了 3'磷酸酶活性。**尤其适用于将 3' 已经磷酸化的单核苷酸 5'磷酸化，制备 pNp 底物；以及 3'端有磷酸基团的寡核苷酸的 5'端进行磷酸化标记。未改造的野生型 T4 多聚核苷酸激酶（AE1001）还具有 3'磷酸酶活性，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。

本公司 T4 PNK(3'磷酸酶活性缺失) 是重组表达，并经多步纯化制备的重组蛋白。

活性定义

1 活性单位指在 37°C下，1× T4 PNK 反应缓冲体系下，30 min 内将 1 nmol ATP 上的磷酸基团掺入酸不溶性物质所需的酶量。

活性测定条件

1× T4 PNK Buffer: 70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT(pH 7.6 @ 25°C), 37°C温育。

浓度: 10U/ μ l

保存条件: -20°C可保存 2 年，避免反复冻融

特点与适用范围

- DNA 或 RNA 5'末端的磷酸化，以便进行连接反应
- DNA 或 RNA 的末端标记，用作探针和进行 DNA 测序
- T4 多聚核苷酸激酶（缺失 3'磷酸酶活性）将 3' 已经磷酸化的单核苷酸 5'磷酸化，制备 pNp 底物，用于添加到 DNA 或 RNA 的 3'端
- 用 T4 多聚核苷酸激酶（缺失 3'磷酸酶活性）对 3'端有磷酸基团的寡核苷酸的 5'端进行标记

产品包装规格及组成

Component	AE1002A	AE1002B
T4 PNK(3'磷酸酶活性缺失)	200U	1000U
10× T4 Polynucleotide Kinase Buffer	0.3ml	1.0ml

质量控制

经过严格的质控检测，确保该产品具有最高的活性和纯度。

酶贮存缓冲液

10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, 0.1 μ M ATP, pH 7.4 @ 25°C

注意事项

- 热失活: 65°C 加热 20 分钟。
- 达到最佳酶活力，需要新鲜缓冲液（在旧缓冲液中，由于氧化造成的 DTT 含量减少会降低酶活力）。
- 放射性标记反应: 50 μ l 反应体系中，用 1×T4 多聚核苷酸激酶反应缓冲液、50 pmol 的 γ -[32P] ATP 和 20 单位的酶 37°C温育 30 分钟可催化 1-50 pmol 的 5'末端磷酸化。[33P] ATP 可代替 [32P] ATP 作标记反应。
- CTP、GTP、TTP、UTP、dATP 及 dTTP 均可替代 ATP 作为磷酸供体。

- 要提高平齐末端或 5'凹陷末端的磷酸化效率，可在加入 T4 多聚核苷酸激酶前，先将 DNA 溶液于 70°C 加热 5 分钟，然后冰上冷却，并加入 5% (w/v) 的 PEG-8,000。
- T4 多聚核苷酸激酶需要 ATP 才能发挥活性，但是为了适用于高活力的放射性标记反应，在随酶提供的反应缓冲液中不含 ATP。
- 一般来说，进行激酶反应之后是连接反应。在这种情况下，T4 多聚核苷酸激酶反应在连接酶反应缓冲液中 37°C 温育 30 分钟即可。反应后的产物可直接进行连接，无需改变缓冲液和进行热失活。如果连接时需要保持其它 DNA 片段的去磷酸化状态，则需要在连接反应前热失活 T4 多聚核苷酸激酶。

相关产品

AE1301: T4 DNA ligase

应用实例

1. 引物或 PCR 产物磷酸化

1) 按下表配制反应体系

反应组分	体积/浓度
10× Buffer	5
ATP (50mM)	0.5-1
待磷酸化引物 (100uM) 或 PCR 产物 (100ng-2ug/ul)	20
T4 Polynucleotide Kinase (10U/μl)	1
H ₂ O	Xul
总体积	50

2) 37°C × 30-120min 反应，

3) 65°C × 20min 失活

警告：本产品仅限科研实验使用，临床应用安全性和有效性未鉴定，不可用于医疗临床诊断。