

T4 PNK Kit

产品编号	产品名称	包装
D7099S	T4 PNK Kit	50次
D7099M	T4 PNK Kit	200次

产品简介:

- 碧云天生产的T4 PNK Kit (T4 Polynucleotide Kinase Kit), 即T4多聚核苷酸激酶试剂盒。本试剂盒基于T4多聚核苷酸激酶(T4 polynucleotide kinase, T4 PNK)的激酶活性, 可用于催化磷酸基团从ATP转移至单链或双链DNA、RNA、寡核苷酸或带有3'磷酸基团的单核苷酸的5'羟基, 实现5'端磷酸化修饰; 同时可以基于T4 PNK的磷酸酯酶活性, 可用于催化单链或双链DNA、RNA、寡核苷酸的3'磷酸的脱磷酸基团的反应。
- 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, 可以催化ATP的 γ 位磷酸基团向单链或双链DNA、RNA、寡核苷酸或带有3'磷酸基团的单核苷酸的5'羟基转移[1]。其它NTP也可产生相同的反应: $5'-OH + NTP \rightarrow 5'-P + NDP$ 。这个磷酸化反应是可逆的。当缺失ATP并且存在ADP的情况下, T4 Polynucleotide Kinase可以显示出5'磷酸酯酶的活性, 催化单链或双链DNA、RNA、寡核苷酸或带有3'磷酸基团的单核苷酸的5'磷酸基团向ADP的转移形成ATP [2]。其它NTP也可产生相同的反应: $5'-P + NDP \rightarrow 5'-OH + NTP$ (最适pH为6.4左右)。当ATP和ADP都适量存在时, T4 Polynucleotide Kinase可以催化单链或双链DNA、RNA、寡核苷酸或带有3'磷酸基团的单核苷酸的5'磷酸基团和ATP的 γ 位磷酸基团之间的交换反应。其它NTP也可产生相同的反应: $5'-P + NTP + NDP \rightarrow 5'-P + NDP + NTP$ 。T4 Polynucleotide Kinase同时具有3'磷酸酯酶活性, 可催化3'磷酸化的多聚核苷酸的去磷酸化: $3'-P \rightarrow 3'-OH + Pi$ (最适pH为5.9左右)。T4 Polynucleotide Kinase的激酶活性在N-末端附近, 而磷酸酯酶活性在C-末端附近。
- 碧云天生产的T4 PNK Kit催化线性双链DNA (Linear double-strand DNA)的5'羟基末端磷酸化和3'磷酸末端去磷酸化的示意图请参考图1。

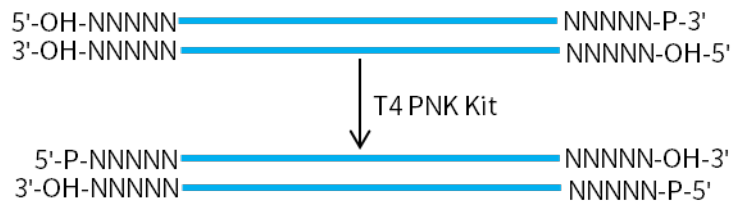


图1. 碧云天生产的T4 PNK Kit催化线性双链DNA的5'羟基末端磷酸化和3'磷酸末端去磷酸化的反应示意图。本试剂盒可以催化5'羟基的磷酸化(5'多聚核苷酸激酶反应)和3'磷酸转变为3'羟基(3'磷酸酯酶反应)共2个常见的反应。蓝色线条部分代表DNA序列。

- 碧云天生产的T4 PNK Kit催化线性双链DNA (Linear double-strand DNA)的5'羟基末端磷酸化的效果请参考图2。

Lambda Exonuclease	-	5min	-	5min	-	30min	-	30min
T4 PNK Kit	-	-	+	+	-	-	+	+

dsDNA

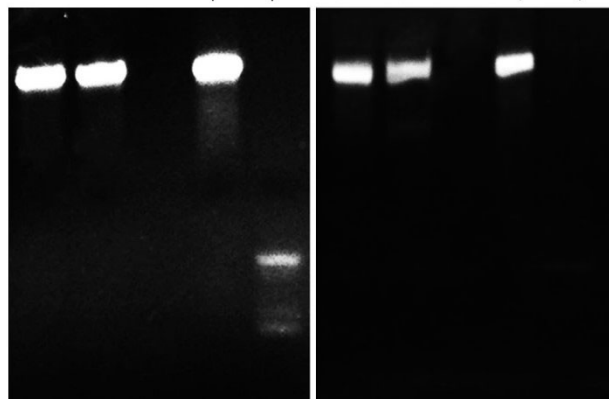


图2. 碧云天生产的T4 PNK Kit (D7099)催化线性双链DNA的5'羟基末端磷酸化的效果图。25 μ l反应体系(磷酸化反应): 20pmol 38bp dsDNA, 1X T4 PNK Buffer, 1 μ l T4 PNK Enzyme, 37 $^{\circ}$ C孵育30分钟进行磷酸化反应。Lambda Exonuclease (D7084)能够高效催化5'磷酸化的双链DNA分子的降解, 对非磷酸化修饰的双链DNA和单链DNA则几乎不能酶切, Lambda Exonuclease对

底物的消化程度越高，说明本试剂盒对dsDNA的磷酸化越完全。20 μ l反应体系(Lambda Exonuclease消化反应): 3.2pmol磷酸化底物, 67mM Glycine-KOH, 2.5mM MgCl₂, 50 μ g/ml BSA (pH9.4 @25°C), 1.25U Lambda Exonuclease, 37°C孵育5分钟或30分钟, 70°C孵育10分钟终止反应, 加入6X DNA Loading Buffer (D0071), 取6 μ l进行Native-PAGE (15%)电泳分析, 最终进行核酸染色和荧光成像分析。如图所示, 本产品对线性双链DNA的5'羟基末端具有良好的磷酸化效果。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **用途:** 进行寡核苷酸、DNA或RNA的5'末端标记, 用作Southern、Northern、EMSA等的探针, 凝胶电泳的marker, DNA测序引物, PCR引物等; 使寡核苷酸、DNA或RNA的5'端磷酸化, 确保后续连接反应顺利进行; 催化3'磷酸化的单核苷酸的5'磷酸化, 使该单核苷酸可以和DNA或RNA的3'末端连接; 去除3'端磷酸基团。
- 本试剂盒的反应体系为25 μ l时, 小包装和中包装可分别使用50和200次。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7099S-1	T4 PNK	50 μ l
D7099S-2	10X T4 PNK Buffer	200 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7099M-1	T4 PNK	200 μ l
D7099M-2	10X T4 PNK Buffer	800 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 至少一年有效。

注意事项:

- 本试剂盒提供的10X T4 PNK Buffer中已经包含了ATP, 无需再额外添加。
- PCR产物需要适当纯化后再用本产品进行5'磷酸化。
- 限制性内切酶消化产生的DNA很多情况下可以不经过纯化步骤, 直接进行5'磷酸化和3'去磷酸化反应。虽然反应效率可能会有一定差异, 但不会影响平端克隆。如果用于高通量测序建库, 需要酌情考虑是否需要纯化后再进行后续反应。
- 本试剂盒中的buffer可以很好地兼容T4 DNA ligase。如果后续用于T4 DNA ligase的连接反应, 无需进行纯化以去除buffer。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. DNA、RNA或寡核苷酸的5'磷酸化和3'去磷酸化反应。

- 参考下表, 在冰浴上设置反应体系。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-Free Water	(21.5-x) μ l	-
Substrate	x μ l	0.8 μ M
10X T4 PNK Buffer	2.5 μ l	1X
T4 PNK	1 μ l	-
Total Volume	25 μ l	-

注1: 按上表设置好反应体系后, 轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用Vortex在最低速度轻轻混匀), 随后离心沉淀液体。

注2: 如果同时进行多个反应, 可以把上表中除底物(Substrate)之外的所有溶液和酶预混合, 然后再分装到各反应管。

- 反应条件: 37°C孵育30分钟。
 - 终止反应: 加入1 μ l 0.5M EDTA (pH8.0)并混匀以终止反应。
 - 后续可以使用酚氯仿抽提、乙醇沉淀等方法纯化反应产物, 也可以使用适当的DNA纯化试剂盒进行纯化, 推荐使用碧云天DNA纯化试剂盒(D0033)或BeyoMag™磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒(D0041)。
2. 其它用途可以参考上述用途或相关文献资料进行。

参考文献:

- Phillips DH, Hewer A, Arlt VM. Methods Mol Biol. 2005. 291:3-12.
- Berkner KL, Folk WR. J Biol Chem. 1977. 252(10):3176-84.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7096	T4 Polynucleotide Kinase	100U

D7097	T4 Polynucleotide Kinase	500U
D7098S	T4 Polynucleotide Kinase	500U
D7098M	T4 Polynucleotide Kinase	2000U
D7098L	T4 Polynucleotide Kinase	10000U
D7099S	T4 PNK Kit	50次
D7099M	T4 PNK Kit	200次
D7100S	T4 Polynucleotide Kinase (3' phosphatase minus)	500U
D7100M	T4 Polynucleotide Kinase (3' phosphatase minus)	2000U
D7100L	T4 Polynucleotide Kinase (3' phosphatase minus)	10000U

Version 2022.10.11