

T4多聚核苷酸激酶

组分	#M0101	#M0102
T4多聚核苷酸激酶 (10 U/μl)	50 μl	50 μl×5
10× T4 PNK 反应缓冲液	1.0 ml	1.0 ml×5

概述: T4多聚核苷酸激酶能够催化磷酸基团在ATP的γ-位和寡核苷酸链（双链或单链DNA或RNA）的5'-羟基末端以及3'-单磷酸核苷间进行转移和交换。该酶还具有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。

来源: 重组*E. coli*菌株，克隆有T4多聚核苷酸激酶基因⁽¹⁾。

应用:

1. DNA或RNA的5'末端磷酸化，以便进行连接反应。
2. DNA或RNA探针的末端标记，进行DNA测序⁽²⁾。
3. 去除核苷酸等的3'磷酸基团⁽³⁾。

贮存溶液: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 @ 25°C), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 μM ATP和50%甘油 (V/V)。

1×T4多聚核苷酸激酶反应缓冲液: 70 mM Tris-HCl (pH 7.6 @ 25°C), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT。

反应条件: 1×T4多聚核苷酸激酶反应缓冲液, 37°C温育。

单位定义: 1单位即1个Richardson单位，指37°C条件下，30分钟内催化1 nmol酸不溶性^[32P]掺入所需要的酶量⁽¹⁾。

热失活条件: 65°C温育20分钟即可失活。

质量控制检测:

核酸外切酶活性: 50 μl反应体系中，300 U本酶与1 μg的Hind III消化的λDNA于37°C温育4小时，电泳条带无明显变化。

核酸内切酶活性: 50 μl反应体系中，200 U本酶与1 μg的pUC19质粒于37°C温育4小时，<10%的pUC19质粒由超螺旋变为缺刻状态。

RNase活性: 50 μl反应体系中，100 U本酶与250 ng的大肠杆菌rRNA于37°C温育2小时，经琼脂糖电泳检测，被降解的rRNA小于1%。

其他酶活性: 50 μl反应体系中，50 U本酶在37°C条件下与5'羟基末端磷酸化的d(T)₈反应，经BIOMOL Green™试剂显色后分光光度计检测，少于1%的产物被磷酸酶降解。

纯度: 经SDS-PAGE (考马斯亮蓝染色) 检测其纯度大于95%。

注意事项:

1. 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。
2. 要提高5'平末端或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，或者在反应体系中加入PEG-8000至终浓度5% (w/v)⁽²⁾。
3. 如果激酶反应之后是连接反应，T4多聚核苷酸激酶可以在T4 DNA连接酶反应缓冲液 (该缓冲液含有适量ATP) 中进行反应，推荐的反应条件为37°C温育30分钟。反应后的产物可直接进行连接，无需改变缓冲液和热失活。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。
4. 当反应缓冲液中含有以下物质时，会对T4多聚核苷酸激酶有不同程度的抑制效应:

50 mM NaCl	无抑制
100 mM NaCl	30%的抑制
150 mM NaCl	50%的抑制
7 mM磷酸	50%的抑制
7 mM硫酸铵	75%的抑制

由于铵离子对T4多聚核苷酸激酶有明显的抑制效应，磷酸化步骤前，DNA不要在含铵离子的溶液中沉淀。

5. CTP、GTP、TTP、UTP、dATP或dTTP均可作为磷酸基团的供体来替代ATP。

T4多聚核苷酸激酶

应用：

DNA 5'末端放射性标记/非放射性磷酸化反应

1. 反应体系

放射性标记反应

待磷酸化DNA	1-50 pmol ^a
10× T4多聚核苷酸激酶缓冲液	5 μl
γ-[³² P]-ATP ^c	50 pM
T4多聚核苷酸激酶	20 U
水	至50 μl

非放射性磷酸化反应

待磷酸化DNA	300 pmol ^a
10× T4多聚核苷酸激酶缓冲液 ^b	5 μl
ATP ^d	1 mM
T4多聚核苷酸激酶	10 U
水	至50 μl

- 该浓度为5'末端的浓度
- 含1 mM ATP的T4 DNA连接酶缓冲液在非放射性磷酸化反应中可以代替1× T4多聚核苷酸激酶缓冲液
- [³²P] ATP可以用[³³P] ATP替代。
- 本产品包装不另附ATP，酶储缓冲液中含0.1 μM ATP。

2. 37°C温育30分钟。

参考文献：

- Richardson, C.C. (1981). P.D. Boyer (Eds.), *The Enzymes*, Vol. 14, (pp. 299-314). San Diego: Academic Press.
- Sambrook, J. et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2nd ed.), (pp 10.59-10.67, 11.31-11.33). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cameron, V. and Uhlenbeck, O.C. (1977). *Biochemistry*, 16, 5120-5126.
- Berkner, K.L. and Folk, W.R. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 3176-3184.