

# T4 Polynukleotidkinase

## T4 Polynukleotidkinase (T4 Bakteriophage aus *Escherichia coli*)

Artikel Nr.	Größe
E1261-01	1 000 Einheiten
E1261-02	5 000 Einheiten

### Definition der Einheit:

Eine Einheit wird als die Menge des Enzyms definiert, die erforderlich ist, um 1 nmol Gamma-Phosphat von ATP auf die 5'-OH Termini von Lachs-DNA Fragmenten in 30 Minuten bei 37°C (6) zu übertragen.

### Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°C

**Hinweis:** T4 Polynukleotidkinase ist in einem breiten Spektrum verschiedener Puffer aktiv. Voraussetzung ist, dass der Puffer 1 mM ATP enthält. T4 PNK Reaktionen können durchgeführt werden, ohne dass DNA aus vorhergehenden Reaktionen aufgereinigt werden müsste. Insbesondere ist T4 PNK mit 1x Puffern für T4 Ligase + 1 mM ATP kompatibel. Der beiliegende 10x T4 PNK Puffer enthält kein ATP, 1 mM ATP muss gesondert zugefügt werden.

### Reaktionsbedingungen der Qualitätskontrolle:

70 mM Tris-HCl (pH 7.6 bei 22°C), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiothreitol, 27 nmol dephosphorylierte Lachs-DNA (5'-OH terminiert) und 70 nM [Alpha-<sup>32</sup>P]ATP. Das Reaktionsvolumen ist 100 µl.

**Polynucleotid-Kinase katalysiert die Phosphorylierung von 5'-Hydroxyltermini in doppel- und einzelsträngiger DNA oder RNA.**

### Beschreibung:

- Katalysiert die Übertragung des Gamma-Phosphats von ATP auf einen 5'-OH Terminus in doppel- und einzelsträngiger DNA oder RNA.
- Enthält 3'-Phosphatase-Tätigkeit (1).
- Wird zur Endmarkierung von Nucleinsäuren für DNA- und RNA-Sequenzierung verwendet (2, 3)
- Phosphoryliert synthetische Verbindungsstücke (linker) und Bruchstücke von DNA oder RNA vor Ligationsreaktionen.
- Markiert 5'-Termini vor partiellen Restriktionsverdau.

### Protokoll für T4 Polynukleotidkinase-Reaktionen:

Um DNA-Fragmente in geschnittene und dephosphorylierte Vektor-DNA zu ligieren, sollten die einzufügenden DNA-Fragmente (Inserts) jeweils Phosphate an ihren 5'-Termini tragen.

Da eine nachträgliche Phosphorylierung von PCR Produkten mit T4 Polynukleotidkinase recht ineffizient ist, sollten Primer vor der PCR-Reaktion phosphoryliert werden.

### Phosphorylierung von PCR-Primern

Eine typische Reaktion zur Phosphorylierung von Primern setzt sich wie folgt zusammen:

Primer (100 pmol/ul)	5 µl
10x T4 PNK Puffer	2.5 µl
10 mM ATP	2.5 µl
H <sub>2</sub> O	14 µl
T4 Polynucleotidkinase (10U/ul)	1 µl

Wenn noch größere Mengen an phosphoryliertem Primer benötigt werden, sollten verwendet werden: 15 µl Primer (100 pmol/ul), 5 µl Puffer, 3 µl PNK, 0.5 µl 100 mM ATP, 26.5 µl dd H<sub>2</sub>O.

Inkubation für 30 min – 1 Std bei 37°C. Langfristige Lagerung bei -20°C (Primer-Endkonzentration: 20 pmol/µl). Hinweis: 1x EURx T4 DNA Ligase Puffer enthält 1 mM ATP und kann den mitgelieferten 10x T4 PNK Puffer in nicht-radioaktiven Reaktionen ersetzen.

Optional: Inaktivierung der Kinase durch Hitze, 5 min bei 70°C. Nach Ethanol-fällung können die Primer ohne Hitzeinaktivierung direkt benutzt werden. Einige Protokolle beschreiben sogar die Verwendung der Primer ohne vorherige Fällung.

### Lagerungspuffer (Storage Buffer):

50 mM Tris-HCl (pH 7.6 bei 22°C), 25 mM KCl, 1 mM Dithiothreitol, 0.1 µM ATP, 0.1 mM EDTA und 50 % (v/v) Glycerin.

### Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf kontaminierende Endonuklease-, Exonuklease- und unspezifische RNase Aktivität untersucht. Eine funktionale Prüfung wird durch Endmarkierungsreaktionen durchgeführt.

### Literatur:

1. Richardson, C.C. (1971) *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology* 2, 815-828.
2. Maxam, A. und Gilbert, W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 560-56.
3. Donis-Keller, H. (1980) *Nucleic Acids Res.* 8, 3133-3142.