

DNA 磷酸化试剂盒使用手册

DNA Phosphorylating Kit

产品及特点

人工合成的 PCR 引物、linker 和 adaptor 的 5' 端一般都是 -OH 基团而不是 -P04 基团（除非额外付费要求在人工合成时加上 -P04 基团），而任何 DNA 连接酶都不能将一个 DNA 分子 5' 端的 -OH 基团和另一个 DNA 分子 3' 端的 -OH 基团进行连接，因此通过人工合成的 DNA 片段和天然 DNA 之间的连接效率一般都比天然 DNA 彼此的连接效率低（天然 DNA 4 个端口均可连接，人工合成的 DNA 跟天然 DNA 有 2 个端口可以连接，人工合成的 DNA 之间没有任何端口可以连接），尤其是在平末端连接时。本公司开发的 DNA 磷酸化产品能将 DNA 分子 5' 端的 -OH 基团磷酸化。它具有下列特点：

1. 可以快速把 DNA 5' 端的 -OH 基团变成 -P04 基团，使人工合成的 DNA（包括 PCR 产物）跟天然 DNA 一样有高的连接效率。
2. 既可以对单链 DNA 进行磷酸化处理，也可以对双链 DNA 片段同时磷酸化处理。
3. 处理后的 DNA 可以直接用于连接反应、克隆等，不需要纯化。
4. 本产品足够 20 次 DNA 的磷酸化实验。

规格及成分

| 成 份 | 编 号 | 20 次包装 |
|-------------------|------------|--------|
| 10×TPK 缓冲液 | BTN130813A | 50 μL |
| ATP 溶液（10 mM） | BTN130813B | 100 μL |
| T4 多核苷酸激酶（10U/μL） | BTN130813C | 20 μL |
| 超纯水 | BTN100935 | 1 mL |

运输及保存

低温运输，-20℃ 保存，有效期为 6 个月。

自备试剂

引物、PCR 产物、DNA 片段

使用方法

一：双链 DNA 片段（5' 端为 -OH 基团的）的磷酸化

注意：如果是 PCR 产物，一定要先胶回收，不能使用没经过纯化的 PCR 反应液，因为其中的残留 PCR 引物会耗掉大量的激酶，降低 PCR 产物的磷酸化效率。

1、在微量离心管中配制下列反应液（20 μL）：

| 成 分 | 用 量 |
|-------------------|-------------------|
| PCR 胶回收片段 | 2 μL（不超过 10 pmol） |
| 10×TPK 缓冲液 | 2 μL |
| ATP 溶液（10 mM） | 5 μL |
| T4 多核苷酸激酶（10U/μL） | 1 μL |
| 超纯水到 | 20 μL |

- 2、37℃反应 30 分钟。
- 3、70℃热处理 5 分钟，灭活酶。
- 4、可直接用于后续克隆（加入量不要超过总体积的 1/5）。

二：单链 DNA 片段的磷酸化

注：单链 DNA 包括局部双链的 DNA。引物，linker，adaptor，Oligo 探针等均按此操作处理。

- 5、在微量离心管中配制下列反应液（20 μL）：

| 成 分 | 用 量 |
|-------------------|-----------|
| 单链 DNA 片段 | 5-10 pmol |
| 10×TPK 缓冲液 | 2 μL |
| ATP 溶液（10 mM） | 1 μL |
| T4 多核苷酸激酶（10U/uL） | 1 μL |
| 超纯水到 | 20 μL |

- 6、37℃反应 30 分钟。
- 7、70℃热处理 5 分钟，灭活激酶。
- 8、可直接用于后续克隆（加入量不要超过总体积的 1/5）。如果使用浓度高，则可能需要乙醇沉淀法浓缩 DNA。如果单链 DNA 的浓度低于 5pmol，还需要在乙醇沉淀时加入核酸助沉剂。沉淀得到的 DNA 可溶解在适量的水中。

附：乙醇沉淀浓度 DNA(本试剂盒不提供相关试剂，下列操作仅供参考)：

- 1、在 DNA 溶液中加入 0.1 倍体积的 3 M 乙酸钠溶液（pH 5.2），
- 2、再加入 2.5 倍体积的无水乙醇和 4uL 核酸助沉剂。
- 3、混匀后 12000g 4℃离心 10 分钟，小心弃上清。
- 4、加入 1mL 70%乙醇，短暂离心 3 分钟后小心弃上清。
- 5、短暂离心 5 秒，吸弃残留液体（约 30-50uL）。
- 6、室温放置 2 分钟干燥后加入适量的超纯水溶解 DNA，立即使用或放-20℃长期保存。

关联产品

DNA 快速连接试剂盒（CAT：BTN70602）