

## Phosphorylation (T4 Polynucleotide Kinase)

### りん酸転移反応

(あらかじめ基質を脱りん酸化しておく必要がある)

DNA や RNA の 5' 末端 OH 基にりん酸基を付加する反応の効率は、一般に次のような順である。

①一本鎖末端>②二本鎖 5' 突出末端>③二本鎖平滑末端>④二本鎖 3' 突出末端

#### 反応例 1 (①、②の場合)

脱りん酸化 DNA <sup>注1)</sup>	5' 末端として 1 ~ 50 pmol <sup>注2)</sup>
10 × Kinase Buffer A (添付)	5 $\mu$ l
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP (111 TBq/mmol, 0.37 MBq/ $\mu$ l)	50 pmol (15 $\mu$ l)
T4 Polynucleotide Kinase	10 ~ 20 units
	ddH <sub>2</sub> O にて 50 $\mu$ l
	37°C、30 分間

#### 反応例 2 (③、④の場合)

脱りん酸化 DNA <sup>注1)</sup>	5' 末端として 1 ~ 50 pmol <sup>注2)</sup>
5 × Kinase Buffer B (添付)	8 $\mu$ l
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP (111 TBq/mmol, 0.37 MBq/ $\mu$ l)	50 pmol (15 $\mu$ l)
T4 Polynucleotide Kinase	20 units
	ddH <sub>2</sub> O にて 40 $\mu$ l
	37°C、30 分間

反応例 1 の方法を行って反応効率が低い場合には、反応例 2 の方法を試してみる。

注 1) 脱りん酸化 DNA は、カラムクロマトグラフィー (Sephacrose CL-4B など) など、低分子量の核酸を取り除いておかねばならない。また、T4 Polynucleotide Kinase は、アンモニウムイオンで強く阻害されるので、アンモニウム塩を含む溶液中の DNA やアンモニウム塩を加えてエタノール沈殿した DNA を基質に用いてはけない。

### りん酸交換反応<sup>注4)</sup>

この方法は、基質 DNA をあらかじめ脱りん酸化しなくてよいので、便利である。

#### 反応例

5' りん酸化 DNA	5' 末端として 1 ~ 50 pmol <sup>注2)</sup>
5 × Kinase Buffer C (添付)	10 $\mu$ l
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP (111 TBq/mmol, 0.37 MBq/ $\mu$ l)	50 pmol (15 $\mu$ l)
T4 Polynucleotide Kinase	20 units
	ddH <sub>2</sub> O にて 50 $\mu$ l
	37°C、30 分間

10 × Kinase Buffer A : 0.5 mol/l Tris-HCl (pH 7.6), 0.1 mol/l MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/l DTT, 1 mmol/l Spermidine, 1 mmol/l EDTA  
 5 × Kinase Buffer B : 250 mmol/l Imidazole-HCl (pH 6.4), 90 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 25 mmol/l DTT, 30% (w/v) PEG6000  
 5 × Kinase Buffer C : 250 mmol/l Imidazole-HCl (pH 6.4), 90 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 25 mmol/l DTT, 0.5 mmol/l Spermidine, 0.5 mmol/l EDTA, 0.5 mmol/l ADP, 5 nmol/l ATP, 24% (w/v) PEG6000

注 2) 1 pmol の 5' 末端とは、二本鎖 DNA の場合、100 塩基対が  $3.3 \times 10^{-2} \mu$ g に相当し、1,000 塩基対が  $3.3 \times 10^{-1} \mu$ g に相当する。

注 3) りん酸交換反応は、りん酸転移反応と比較してその効率が 1/5 ~ 1/10 に低下する。

### 使用例 (PCR 産物のリン酸化)

PCR 産物のリン酸化には、プライマーをリン酸化してから PCR に使用する方法 (一本鎖末端) と、PCR 産物をリン酸化する方法 (二本鎖平滑末端、二本鎖 3' 突出末端) のどちらかになります。リン酸化反応は二本鎖末端よりも一本鎖末端の方が効率良く行えます。

#### 反応例 1

プライマー	5' 末端として 1 ~ 50 pmol
10 × Kinase Buffer A	5 $\mu$ l
10 mM rATP	5 $\mu$ l (終濃度 1 mM)
T4 Polynucleotide Kinase	20 units
ddH <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ l

37°C で 30 分間反応

70°C、10 分間の加熱で酵素反応を停止

すぐに使用しない場合は、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出およびエタノール沈殿による精製を行う。

#### 反応例 2

PCR 産物	5' 末端として 1 ~ 50 pmol
5 × Kinase Buffer B	8 $\mu$ l
10 mM rATP	5 $\mu$ l (終濃度 1 mM 程)
T4 Polynucleotide Kinase	20 units
ddH <sub>2</sub> O	up to 40 $\mu$ l

37°C で 30 分間反応

フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出およびエタノール沈殿による精製

#### DNA 5' 末端濃度 換算式

$$\text{pmol of 5' ends} = [\text{g of DNA} / (\text{bp of DNA} \times 660 \text{ g/mol/bp})] \times 10^{12} \text{ pmol/mol} \times 2 \text{ ends/molecule}$$

例) ・ 20 mer の一本鎖 DNA 1  $\mu$ g は約 150 pmol of 5' end に相当します。

$$\text{約 150 pmol of 5' end} \doteq [0.000001 / (20 \times 330)] \times 1,000,000,000,000 \times 1$$

・ 1 kbp の直鎖状二本鎖 DNA 1  $\mu$ g は 1.52 pmol (約 3 pmol of 5' end) に相当します。

$$\text{約 3 pmol of 5' end} \doteq [0.000001 / (1,000 \times 660)] \times 1,000,000,000,000 \times 2$$