

ExCell Bio

T4 DNA Polymerase

User Manual

Catalog Number MB000-1571

MB000-1572

MB000-1573



产品概述

在模板和引物存在的条件下，T4 DNA 聚合酶能够催化沿 5'→3'方向合成 DNA。此酶还具有 3'→5'外切核酸酶的活性，该活性比 DNA 聚合酶 I 强 200 多倍。但与 DNA 聚合酶 I 不同，T4 DNA 聚合酶不具有 5'→3'核酸外切酶活性。

含有 T4 DNA Polymerase 基因的重组表达载体，经 *E.coli* 重组表达纯化制成，分子量 106KDa, N 端含有 6 个 His 标签。

技术参数

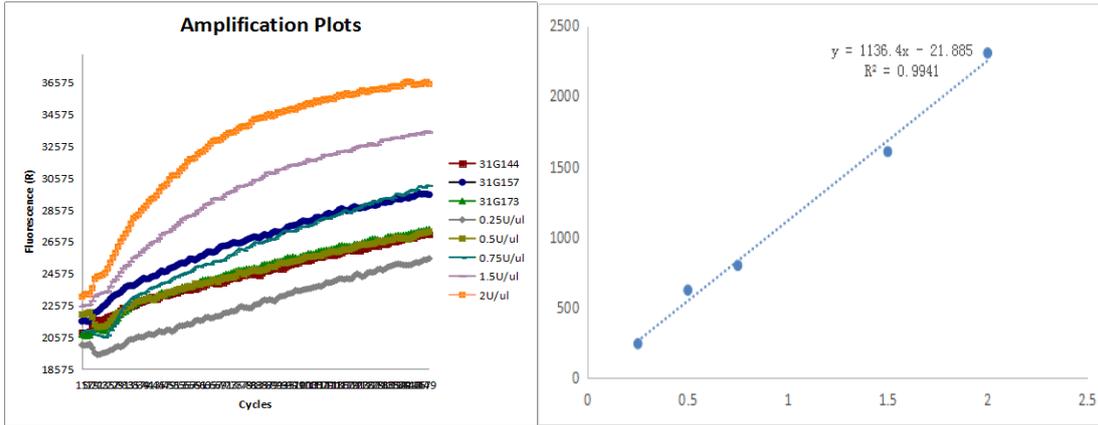
| | |
|----------|---|
| 酶储存溶液 | 0.1M KPO ₄ (pH7.4 @ 25°C), 2mM DTT, 50%Glycerol |
| 10x 酶反应液 | 100 mM Tris-HCl(pH7.9@ 25°C),100 mM MgCl ₂ ,10mM DTT, 500 mM NaCl. |
| 纯度 | 经过 SDS-PAGE 电泳和考马氏亮蓝染色, 灰度扫描分析, 纯度大于 95%。 |
| 核酸内切酶活性 | 50 U 的本酶和 1 μg 的 ΦX174 DNA 在 37°C 下反应 4 小时, 小于 10%的 RFI 型转变为 RFII 型。 |
| 活性单位浓度 | 3,000 U/ml |

活性分析

一个活性单位是在该酶的反应缓冲液中，含有 33μM dNTP [含 ³H-dTTP], 70μg/ml 鲑鱼精 DNA 和 50μg/ml 的 BSA, 37°C 时 30 分钟内催化 10nmol dNTP 渗入到酸不溶性沉淀物中所需要的酶量为一个活性单位。

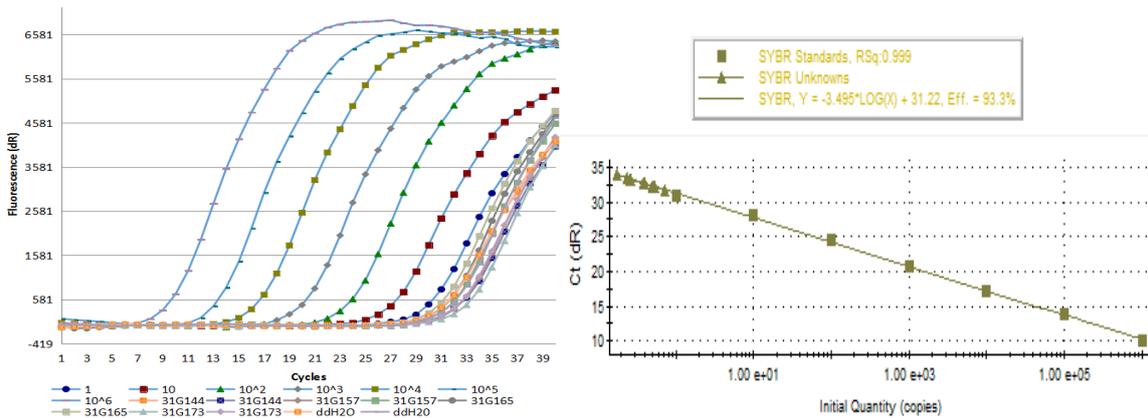
相关数据

1. 活力测定



采用特定的模板和单引物进行扩增，将国外著名品牌公司的酶做系列稀释，在反应体系中加入 0.3125-5 U 的酶，在反应的起始阶段其荧光增量与酶量呈现出线性关系，本公司生产的酶与国外著名品牌公司的酶比活力的两倍。

2. 大肠杆菌基因组残留



| Sample | CT(dR) | Copies |
|--------|--------|---------|
| DDH2O | 32.67 | 0.41976 |
| | 32.18 | |
| 31G144 | 32.25 | 0.30690 |
| | 33.39 | |
| 31G157 | 33.27 | 0.26730 |
| | 32.61 | |
| 31G165 | 32.16 | 0.57943 |
| | 31.71 | |
| 31G173 | 33.85 | 0.16865 |
| | 33.23 | |

采用 QPCR 方法，E.coli 基因组 DNA (gDNA) 做系列稀释，做标准曲线，测量成品中 1 μ l 酶液中含有的大肠杆菌基因组残留拷贝数，根据 CT 与拷贝数的关系，得出 1 μ l 酶液中含有的大肠杆菌基因组残留拷贝数小于 1 个拷贝。

产品应用

补平 5'突出末端或切除 3'突出末端；

基因点突变后的第二链合成；

采用该酶较强的 3'→5'外切核酸酶的活性，通过置换合成法从 DNA 片段的 3 末端标记探针。

产品规格

| | 货号 | 规格 |
|---|------------|---------|
| 1 | MB000-1571 | 150 U |
| 2 | MB000-1572 | 750 U |
| 3 | MB000-1573 | 3,000 U |

产品组分及储存条件

| 货号 | 规格 | 组分 | |
|------------|---------|-------------------|-----------------------------|
| | | T4 DNA Polymerase | 10 \times Reaction Buffer |
| MB000-1571 | 150 U | 1 管 | 0.5 ml \times 1 管 |
| MB000-1572 | 750 U | 1 管 | 1.0 ml \times 1 管 |
| MB000-1573 | 3,000 U | 1 管 | 1.0ml \times 3 管 |

-20 $^{\circ}$ C条件下运输和保存。

实验流程

以 DNA 末端平滑化实验为例

| | |
|--------------------|------------------|
| 10xReaction Buffer | 2 μ l |
| 突出末端 DNA 片段 | 0.5-1 μ g |
| dNTPs (10m M) | 0.2 μ l |
| ddH ₂ O | up to 17 μ l |
| 0.1% BSA | 2 μ l |

以上溶液混匀后，加入 1 μ l 的 T4 DNA Polymerase (1 U/ μ l)混匀后短暂离心，12 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟或 25 $^{\circ}$ C 反应 5 分钟。

反应结束后，为了避免过剩反应，把反应液置于冰上。进行连接反应时，最好马上进行。如果不立刻进行下一步反应，应加入终浓度为 10m M 的 EDTA，70 $^{\circ}$ C 加热 20 分钟离心取上清用于后续实验。

注意事项

1.由于该酶具有 3' \rightarrow 5' 核酸外切酶的活性，提高反应温度、增加酶量、没有加入 dNTPs 或反应时间过长都可能造成 DNA 末端碱基被切除形成凹陷。

2.该酶在 T4 连接酶缓冲液中也有活性，T4 DNA Polymerase 反应液中没有 BSA 时，需要在实验时加入终浓度 100 μ g/ml 的 BSA。

3.反应需要 Mg²⁺和 SH 试剂如 DTT 的参与，DTT 氧化减少会导致该酶活性的降低。

4.本酶易受模板 DNA 高级结构的影响，T4 gene 32 产物可以显著提高聚合酶活性，而 3' \rightarrow 5'的外切核酸酶活性则完全被抑制。

5. 70 $^{\circ}$ C 加热 20 分钟可以失活。