

T4 DNA Polymerase

Code No. 2040A

包装量: 100 U
浓度: 5 U/μl

附带试剂:

10X T4 DNA Polymerase Buffer 1 ml
0.1% BSA 1 ml

制品说明:

在模板及引物存在的条件下, 催化与模板互补的脱氧核苷酸依次选择性地连接在引物的3' -OH末端上的反应。本酶还具有单链DNA特异性的3' →5' 外切核酸酶活性, 该活性比Klenow Fragment强100~1,000倍。本酶没有5' →3' 的外切核酸酶活性。

酶贮存溶液:

200 mM Potassium Phosphate (pH6.5)
1 mM DTT
50% Glycerol

保存: -20°C

起源:

Escherichia coli carrying the plasmid containing phage T4 DNA polymerase gene.

活性定义:

以活化 Poly(dA-dT) DNA 为模板/引物, 在 37°C、pH8.8 条件下, 30 分钟内使 10 nmol 的 dATP 和 dTTP 掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量, 定义为 1 个活性单位(U)。

活性定义反应液:

67 mM Tris-HCl, pH8.8
6.7 mM MgCl₂
16.6 mM (NH₄)₂SO₄
1 mM DTT
6.7 μM EDTA
0.0167% BSA
7 μg/ml 活化 Poly(dA-dT)
330 μM each dATP, dTTP
8 μCi/ml [³H] dTTP

质量控制:

请查阅各批次 Certificates of Analysis (CoA)。产品 CoA 请在 Takara Bio Inc. 网站中下载:

https://catalog.takara-bio.com.jp/search/doc_index.php。

用途:

1. 利用较强的 3' →5' 的外切核酸酶活性, 通过置换合成从 DNA 片段的 3' 末端进行标记³⁾。
2. DNA 末端的平滑化⁴⁾。
3. 通过引物延伸法解析 mRNA 转录的起始点⁵⁾。

使用注意:

1. 本酶的最适 pH 为 8-9, 在 pH7.5 及 pH9.7 时活性降低 50%。
2. 活性的表达需要 Mg²⁺ 的存在。为了获得较大活性, 还需要 SH 基的还原剂存在¹⁾。
3. 整个反应体系中的离子强度超过 100 mM 时活性将被抑制²⁾。
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' →5' 的外切核酸酶活性则完全被抑制。

添附Buffer组成 (保存: -20°C) :

1. 10X T4 DNA Polymerase Buffer
330 mM Tris-acetate, pH7.9
660 mM CH₃COOK
100 mM (CH₃COO)₂Mg
5 mM DTT

2. 0.1%BSA

本 buffer 与活性定义所用 buffer 不同, 含有双链 DNA 末端平滑化实验的主要成分。

在 10X 反应缓冲液中直接加入 0.1% BSA 时会产生大量白色沉淀, 因此, 在调制反应液时请按下列顺序添加试剂:

灭菌水 → 反应缓冲液 → 0.1% BSA → 底物 DNA。

使用例:

DNA 片段的末端平滑化

1. 在微量离心管内配制下列反应液, 全量为 9 μl。

突出末端 DNA 片段 >0.1 pmol
10X T4 DNA Polymerase Buffer 1 μl
0.1% BSA 1 μl
1.7 mM dNTP Mixture 1 μl
灭菌水 up to 9 μl

2. 为防止 DNA 末端的“退火”(Annealing), 先在 70°C 进行 5 分钟保温后, 移入 37°C 的恒温槽中。

3. 加入 1 μl 的 T4 DNA Polymerase(1 U/μl: 用 1X 附带缓冲液等进行稀释), 用取样器轻轻混合 (Pipetting), 避免用振荡器剧烈搅拌。

4. 在 37°C 保温 5 分钟。

5. 用振荡器剧烈搅拌使酶失活 (用振荡器搅拌后酶几乎全部失活。为了避免过剩反应, 把反应液置于冰中。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, 应进行苯酚/氯仿处理、乙醇沉淀后在 -20°C 下保存。)

参考文献:

- 1) Lehman I R. *Methods in Enzymology*. (1974) **29**: 46-53.
- 2) Goulian M, Lucas Z J, and Kornberg A. *J Biol Chem*. (1968) **243**: 627-638.
- 3) Deen K C, Landers T A, and Berninger M. *Anal Biochem*. (1983) **135**: 456-465.
- 4) Wartell R M, and Reznikoff W S. *Gene*. (1980) **9**: 307-319.
- 5) Hu M C T and Davidson N. *Gene*. (1986) **42**: 21-29.

注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品, 或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权, 请联络我们, 或访问我们网站 www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术 (北京) 有限公司翻译制作, 最新版本文件请参考 Takara Bio Inc. 网站。为正确使用 Takara 产品, 您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

v202306Da