

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

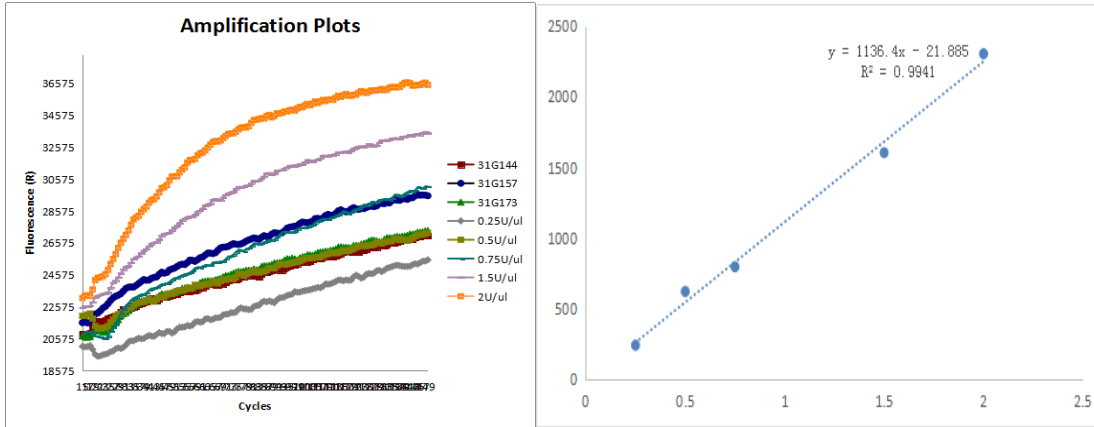
酶储存溶液	0.1M KPO ₄ (pH7.4 @ 25°C), 2mM DTT, 50%Glycerol
10x 酶反应液	100 mM Tris-HCl(pH7.9@ 25°C),100 mM MgCl ₂ ,10mM DTT, 500 mM NaCl.
纯度	经过 SDS-PAGE 电泳和考马氏亮蓝染色, 灰度扫描分析, 纯度大于 95%。
核酸内切酶活性	50 U 的本酶和 1 μg 的 ΦX174 DNA 在 37°C 下反应 4 小时, 小于 10%的 RFI 型转变为 RFII 型。
活性单位浓度	3,000 U/ml

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。

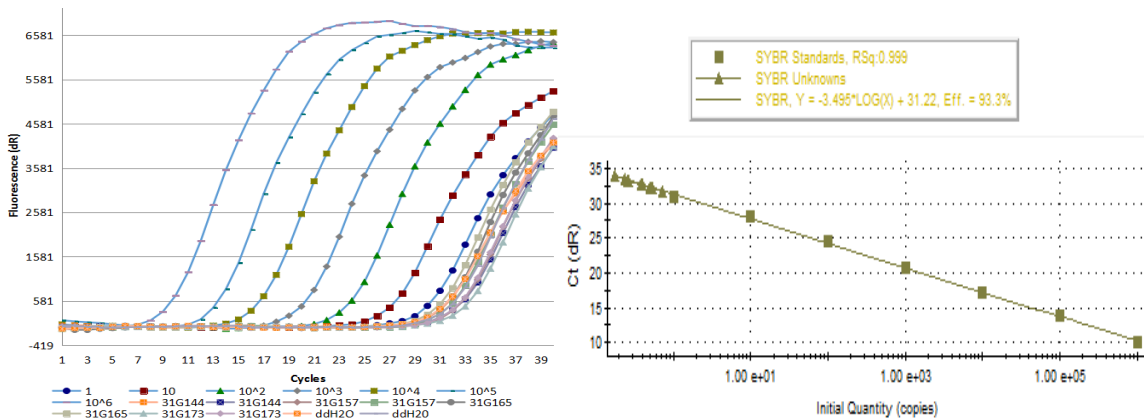
相关数据

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。