

DNA聚合酶 I (*E. coli*)

组分	#M0031	#M0032
DNA聚合酶I (10 U/μl)	50 μl	50 μl×5
10× DNA Polymerase I 反应缓冲液	1.5 ml	1.5 ml×5

概述: DNA聚合酶I是依赖于DNA的DNA聚合酶，具有3'→5'和5'→3'核酸外切酶活性⁽¹⁾。该酶的5'→3'外切酶活性能够切除位于延伸链前端的核苷酸，从而使切刻平移成为可能。

来源: 重组*E. coli*菌株，携带有高表达的*polIA*基因。

应用:

1. DNA的切刻平移，制备具有高比活性的探针⁽²⁾。

2. cDNA的第二条链的合成^(3,4)。

贮存条件: 25 mM Tris-HCl (pH 7.4 @ 25°C), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50%甘油 (V/V)。

反应条件: 1×DNA聚合酶I反应缓冲液，加入dNTPs (不随酶提供)，37°C温育。

1×DNA聚合酶I反应缓冲液: 10 mM Tris-HCl (pH 7.9 @ 25°C), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT。

单位定义: 1单位指37°C条件下，30分钟内能催化10 nmol的dNTPs掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量。

活性检测条件: 1×DNA聚合酶I反应缓冲液中加入33 μM dNTPs包括[³H]-dTTP和70 μg/ml热变性鲑鱼精DNA。

热失活条件: 75°C加热20分钟失活。

质量控制检测:

核酸内切酶活性: 50 μl反应体系中，25 U本酶与1 μg的pUC19质粒于37°C温育4小时，<10%的pUC19质粒由超螺旋变为缺刻状态。

使用注意事项:

本品不含DNase I，因此切刻平移反应时需额外添加DNase I。

参考文献:

1. Lehman, I.R. (1981). In P.D. Boyer (Ed.), *The Enzymes* Vol. 14A, (p. 16-38). San Diego: Academic Press.
2. Meinkoth, J. and Wahl, G.M. (1987). *Methods Enzymology*, 152, 91-94.
3. Gubler, U. and Hoffmann, B.J. (1983). *Gene*, 25, 263-269.
4. D' Alessio, J.M. and Gerard, G.F. (1988). *Nucleic Acids Res.*, 16, 1999-2014.

应用:

缺口平移反应放射性标记DNA

1. 混合以下组分:

10×DNA聚合酶I反应缓冲液	2.5 μl
3种dNTP混合物 (每种1 mM, 不含标记的dNTP)	1.25 μl
[α- ³² P]-dNTP (~110 TBq/mmol, 3000 Ci/mmol)	1.85-3.7 MBq (50-100 μCi)
DNase I, RNase-free新鲜稀释至0.002 U/μl	1 μl
DNA聚合酶I (<i>E. coli</i>)	0.5-1.5 μl (5-15 U)
模板DNA	0.25 μg
水	至25 μl
总体积	25 μl



DNA聚合酶 I (*E.coli*)

2. 立即在15°C中孵育15-60分钟。
3. 加入1 μ l 0.5 M EDTA (pH 8.0) 终止反应。
4. 取少量 (1 μ l) 产物检测标记物掺入效率。特异活性不应低于 10^8 cpm/ μ g DNA。
5. 如有必要, 可用Sephadex G-50或Bio-Gel P-60柱纯化已标记的DNA。
6. 上述反应体系也可用于DNA的非放射性标记。缺口平移反应时使用的标记物为biotin-11-dUTP、fluorescein-12-dUTP、DIG-dUTP或aminoallyl-dUTP:
 - 正常的dTTP被标记的dUTP部分替代, 摩尔比为1:3-1:5;
 - 反应时间延长至1-2小时。