

Psp GBD (exo⁻) DNA聚合酶

组分	#M0171	#M0172
<i>Psp</i> GBD (exo ⁻) DNA聚合酶 (2 U/μl)	100 μl	100 μl×5
10× Thermo PCR缓冲液	1.5 ml	1.5 ml×5
100 mM MgSO ₄	1.5 ml	1.5 ml×5

概述: *Psp* GBD (exo⁻) DNA聚合酶 (也被称为Deep Vent (exo⁻) DNA聚合酶) 是利用基因工程技术去除了*Psp* GBD DNA聚合酶的3'→5'核酸外切酶校对活性而得到的。*Psp* GBD (exo⁻) DNA聚合酶在95°C时的半衰期是23小时, 在100°C时半衰期是8小时。*Psp* GBD (exo⁻) DNA聚合酶和*Tli* (exo⁻) DNA聚合酶都适用于引物延伸和高温 (72°C) 测序。

来源: *Psp* GBD (exo⁻) DNA聚合酶纯化自重组*E. coli*菌株, 该菌株携带有*Psp* GBD DNA聚合酶 (D141A / E143A) 基因⁽¹⁾。

应用: 引物延伸、PCR。

贮存溶液: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 @ 25°C), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100和50%甘油 (V/V)。

反应条件: 100 μl反应体系含: 1×反应缓冲液, MgSO₄ (补加或不补加), DNA模板, 引物, dNTPs和2-4 U聚合酶。

1×反应缓冲液: 20 mM Tris-HCl (pH 8.8 @ 25°C), 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100 (V/V)。

单位定义: 1单位指75°C条件下反应30分钟, 能使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×反应缓冲液, 每种dNTP (包括[³H]-dTTP) 各200 μM以及200 μg/ml的活化小牛胸腺DNA。

热失活条件: 无。

95°C半衰期:

Psp GBD DNA聚合酶 23小时

Tli DNA聚合酶 6.7小时

Taq DNA聚合酶 1.6小时

质量控制检测:

核酸外切酶活性: 50 μl反应体系中, 20 U本酶与1 μg的Hind III消化的λDNA于37°C温育4小时, 电泳条带无明显变化。

核酸内切酶活性: 50 μl反应体系中, 20 U本酶与1 μg的pUC19质粒于37°C温育4小时, 电泳条带无明显变化。

纯度: 经SDS-PAGE (考马斯亮蓝染色) 检测其纯度大于95%。

参考文献:

1. Jannasch, H.W. et al. (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3472-3481.

用耐热*Psp* GBD (exo⁻) DNA聚合酶进行PCR反应的参考条件:

基本反应条件: 1×反应缓冲液, DNA模板, *Psp* GBD (exo⁻) DNA聚合酶, 1-6 mM MgSO₄, 每种dNTP各200-400 μM以及0.4 μM的引物。其中, 需要优化的最重要的三个变量是聚合酶的量、引物退火温度和镁离子浓度。对于每个新的引物:模板比例要求重新优化这些变量。

酶量: 用最适酶量进行反应是非常重要的, 特别是当使用有校对功能的DNA聚合酶时。对于有校对功能的DNA聚合酶, 从每100 μl反应体积加入1单位酶量开始; 对核酸外切酶活性缺失型衍生酶, 则从每100 μl反应体积加入4单位酶量开始 (不同反应体积相应地调整这个比例)。总的来说, 在引物延伸反应中, DNA模板浓度较低时, 需要使用推荐范围内较低的聚合酶用量。

推荐酶量: *Psp* GBD (exo⁻) DNA聚合酶2-4 U/100 μl反应体积。

退火温度: 引物的最适退火温度通常可以通过几种标准计算方法来预算。如果用计算的退火温度所得结果不理想, 则以每3°C递增来确定合适的退火温度。

镁离子浓度: 最适镁离子浓度通常是2、4或6 mM。如果反应的DNA样品中含有较多的EDTA, 则镁离子浓度优化范围需适当提高。当模板DNA片段大于2 kb时, *Psp* GBD (exo⁻) DNA聚合酶一般需要大于2 mM的镁离子浓度, 而对于模板DNA片段小于2 kb的PCR反应, 延伸长度和最适镁离子浓度间无相关性。



Psp GBD (exo⁻) DNA聚合酶

Psp GBD (exo⁻) DNA聚合酶PCR反应体系和程序:

1. 50 μ l 反应体系, 冰上操作

成分	体积 (μ l)	终浓度
10 \times 反应缓冲液	5 μ l	1 \times
dNTP Mix (10 mM each)	1 μ l	200 μ M
上游引物 (10 μ M)	0.5-2.5 μ l	0.1-0.5 μ M
下游引物 (10 μ M)	0.5-2.5 μ l	0.1-0.5 μ M
DNA模板	根据具体情况添加	
<i>Psp</i> GBD (exo ⁻) DNA聚合酶*	0.5-1 μ l	1-2单位
MgSO ₄	可选	1-6 mM
水	补充至50 μ l	

[*]: 当微量体积的酶比较难吸取时, 可将酶稀释于1 \times 反应缓冲液中。

2. 混匀并短暂离心。

如果PCR仪没有热盖功能, 可在液体表面添加少许石蜡油防止蒸发。

3. PCR反应程序

步骤	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}$ C	2-5 min
20-30个循环	95 $^{\circ}$ C	15-30 s
	55-65 $^{\circ}$ C	15-30 s
	72 $^{\circ}$ C	1 min/kb
延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min
保存	4-10 $^{\circ}$ C	