

phi29 DNA聚合酶

组分	#M0191	#M0192
phi29 DNA聚合酶 (10 U/μl)	10 μl	10 μl×5
10× phi29 反应缓冲液	0.5 ml	0.5 ml×5

概述: phi29 DNA聚合酶是从*Bacillus subtilis*噬菌体phi29中克隆出的嗜温DNA聚合酶⁽¹⁾。除了具有3'→5'外切酶较读功能⁽²⁾，还具有特殊的链置换和连续合成特性⁽³⁾。

来源: 重组*E. coli*菌株，携带有噬菌体phi29 DNA聚合酶基因。

应用:

1. 高度链置换和连续合成的扩增。
2. 恒温下高保真度扩增。

贮存条件: 100 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 @ 25°C), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.5% Tween 20, 0.5% NP-40和50%甘油 (V/V)。

随酶提供的试剂: 10× phi29 DNA聚合酶反应缓冲液, 10 mg/ml BSA。

反应条件: 1× phi29 DNA聚合酶反应缓冲液, 200 μg/ml BSA, 30°C温育。

1× phi29 DNA聚合酶反应缓冲液: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 @ 25°C), 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM MgCl₂, 4 mM DTT。

单位定义: 1单位指30°C条件下, 10分钟内能催化0.5 pmol的dNTPs掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量。

活性检测条件: 1X phi29 DNA聚合酶反应缓冲液, 0.1 mg/ml BSA, 0.01 mg/ml Hind III消化的λDNA, dNTPs (包括[³H]-dTTP)各0.2 μM。

热失活: 65°C温育10分钟即可失活。

质量控制检测:

核酸内切酶活性: 50 μl反应体系中, 100 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。

注意事项:

该酶缓冲液中含有还原剂DTT以便保证其最大酶活性。如果缓冲液不新鲜或经过反复冻融, 使用前应添加4 mM的DTT。

参考文献:

1. Blanco, L. and Salas, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5325-5329.
2. Garmendia, C. et al. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 2594-2599.
3. Blanco, L. et al. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264, 8935-8940.

应用:

利用phi29 DNA聚合酶的特殊链置换和连续合成特性, 可以大大简化用于测序的环状质粒制备过程, 应用以下方法, 从细胞培养液或者直接挑取菌落 (无需繁琐的细胞培养、细菌收集和裂解以及质粒DNA分离与纯化, 无需PCR仪器), 就可以扩增克隆有目的基因的质粒, 以便后续的测序检测。

从细胞培养液中扩增质粒: 取1 μl对数中后期培养物用于以下反应。

直接挑取菌落法: 挑取琼脂板上的菌落 (尽量避免挑取到培养基) 移至10 μl的双蒸水中, 混匀, 取1 μl用于以下反应。

扩增已纯化的环状质粒: 质粒稀释至1 μg/ml。