

Phi29-fast DNA Polymerase

目录号: RK21003

规格: 250 U / 1,250 U

浓度: 10,000 U/mL

产品组成:

phi29-fast DNA Polymerase (10,000 U/mL)	RM20502
10X phi29 DNA Polymerase Reaction Buffer	RM20113

产品说明

Phi29 DNA Polymerase 是从 *Bacillus subtilis* 噬菌体 phi29 中克隆得到的嗜温 DNA 聚合酶。而 phi29-fast DNA 聚合酶是通过基因工程方法对 phi29 DNA 聚合酶的 DNA 结合结构域进行改造获得的, 极大地提高了扩增效率。

Phi29-fast DNA 聚合酶具有多重链置换和连续合成特性。该酶保留了固有的 3'-5' 核酸外切酶(校正)活性, 相较于传统的 Phi29 DNA 聚合酶, phi29-fast DNA 聚合酶在以环状质粒和基因组 DNA 为模板的扩增反应中表现出更高的效率。

Phi29-fast DNA 聚合酶适用于: 复制中需要多重置换和连续合成的反应; 反应温度适中且要求高效率、高保真的反应。

产品来源

从 *Bacillus subtilis* 噬菌体 phi29 中分离并改造后的 phi29 DNA 聚合酶基因是在大肠杆菌中表达并经过多步纯化精制而成。

活性定义

1 活性单位 (U) 是指在 30°C 反应 10 min 内, 使 0.5 pmol 的 dNTPs 转变成酸不溶性物质所需的酶量。

酶存储液

10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.5% Tween-20, 0.5% NP-40, 50% Glycerol, pH 7.5 @ 25°C

保存温度: -20°C

反应条件

1X phi29 DNA Polymerase Reaction Buffer, 30°C 反应

1X phi29 DNA Polymerase Reaction Buffer 组成

50 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM MgCl₂, 4 mM

DTT, pH 7.5 @ 25°C

热失活: 65°C 加热 10 min

5'-3' 核酸外切酶活性: 无

3'-5' 核酸外切酶活性: 有

操作说明

1. 在冰上配制如下反应体系 (以 10 μL 反应体系为例):

组分	加入量
随机引物 (10 μM) (自备)	1-5 μL
DNA 样品 (1 μg/mL) (自备)	1 μL
ddH ₂ O	to 7 μL

2. 混匀并瞬时离心后, 95°C 反应 3 min。

3. 快速置于冰上冷却 15 min。

4. 向上述体系中加入反应的其他组分, 按下表推荐在冰上加入:

组分	加入量
上述反应体系	7 μL
dNTPs (10 mM) (自备)	0.5 μL
10X phi29 DNA Polymerase Reaction Buffer*	1 μL
phi29-fast DNA Polymerase **	0.25-1 μL
ddH ₂ O	to 10 μL

*, 注: 反应体系中添加了终浓度为 4 mM 的 DTT 以确保酶的活性。

**, 注: 第一次使用时, 建议对酶量进行梯度稀释以确定最佳酶量。

5. 混匀并瞬时离心后, 30°C 至少反应 4 hr。

6. 反应完成后, 65°C 加热 10 min 使 phi29-fast DNA 聚合酶失活。

7. 若用于后续测序, 建议取 2 μL 反应混合物加入到 8 μL 无酶水中。

质量控制

- ◆ SDS-PAGE 检测蛋白纯度大于 95%。
- ◆ 无核酸外切酶、核酸酶和 RNA 酶污染。
- ◆ PCR 检测无宿主基因组残留。