

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		250 U	1250 U
phi29 DNA Polymerase (10,000 U/ml)	RM20501	25 µL	125 µL
10X phi29 DNA Polymerase Reaction Buffer	RM20113	1.25 mL	1.25 mL

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。Phi29 DNA 聚合酶具有多重链置换和连续合成特性, 并且具有 3'-5' 核酸外切酶(校正)活性。Phi29 DNA 聚合酶适用于: 复制中需要多重置换或连续合成的反应; 反应温度适中且要求高保真的反应。

产品来源

从 *Bacillus subtilis* 噬菌体 Phi29 中分离的 phi29 DNA 聚合酶基因在大肠杆菌中表达并经过多步纯化精制而成。

酶活定义

1 活性单位 (U) 是指在 30°C 10 min 内, 将 0.5 pmol 的 dNTPs 变成不溶于酸的物质时所需的酶量。

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'外切酶活性

无

3'-5'外切酶活性

有

链置换活性

强

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):

试剂	7 µL
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：

试剂	10 μ L
上述反应体系	7 μ L
dNTPs (10 mM) (自备)	0.5 μ L
10X phi29 DNA Polymerase Reaction Buffer*	1 μ L
phi29 DNA Polymerase **	0.2-1 μ L
ddH ₂ O	to 10 μ L

*，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，在 30°C 条件下过夜。

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

7. 若用于后续测序，建议取 2 μ L 反应混合物加入到 8 μ L 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。