

产品说明

Sulfolobus DNA 聚合酶 IV 是一种热稳定的 Y 家族 DNA 聚合酶,能在复制过程中绕过 DNA 损伤,因而能以多种损伤 DNA 为模板合成 DNA。Sulfolobus DNA 聚合酶 IV 在 DNA 复制过程中会发生碱基错误掺入,产生碱基突变。同时还会发生模板碱基滑动,导致碱基 deletion 缺失。由于具有很低的忠实性,可用于 error-prone PCR,提高随机突变率。

本公司 Sulfolobus DNA polymerase IV 是重组表达,并经多步纯化获得的重组酶。

活性定义

1 单位指在温度为 55°C, 1× AM Buffer E (聚合酶 buffer) 缓冲体系的反应条件下, 30 min 内将 10 nmol dNTP 掺入酸不溶性物质所需的酶量。

活性测定条件

1× AM Buffer E, 55°C 温育。

浓度: 1U/μl

保存条件: -20°C 保存

特点

- 模板损伤碱基耐受性强
- 可以复制存在 DNA 损伤的模板 DNA

适用范围

- 损伤 DNA 模板的跨越损伤合成
- 正常模板 DNA 的随机突变
- 低忠实性缝隙填充(无链置换和切口平移活性)

产品包装规格及组成

| Component | AE0651A | AE0651B |
|------------------------------|---------|---------|
| Sulfolobus DNA polymerase IV | 100U | 500U |
| 10× AM Buffer E | 0.5ml | 1.5ml |

质量控制

相关测试表明无外源内切、外切脱氧核糖核酸酶、RNase 污染。

酶贮存缓冲液

10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1mM EDTA, 50% Glycerol, pH 7.4@ 25°C。

注意事项

- Sulfolobus DNA 聚合酶 IV 不能用于高保真性 DNA 合成反应。
- 损伤 DNA 作为模板的引物延伸反应
- 在 error-prone PCR 中可以提高随机突变率,且突变率和 Sulfolobus DNA 聚合酶 IV 加入量相关。

警告: 本产品仅限科研实验使用, 临床应用安全性和有效性未鉴定, 不可用于医疗临床诊断。

应用实例

1. 随机突变 DNA 制备

1) 按下表配制反应体系

| 反应组分 | ul |
|------------------|------------|
| 10× Buffer | 5 |
| 10mM dNTP | 2 |
| primer (100μM) | 2 |
| 模板 cDNA 或单链 DNA | 100-1000ng |
| H ₂ O | Variable |
| 总体积 | 50 |

2) 加入 1ul Sulfolobus DNA 聚合酶 IV (1U/ul), 50-60℃保温 30min;

3) 跑胶检测双链 DNA 延伸结果;

4) 按需进行后续实验, 例如进行随机突变文库的构建和筛选。

2. 随机突变 PCR

注: 以下反应举例为 50 μl 标准 PCR 体系, 仅供参考。实际 PCR 条件应根据模板、引物、目的片段大小加以优化, 确定最佳反应条件。

| 组份 | 体积/μl | 终浓度 |
|------------------------------|-----------|--------|
| 10×Taq Buffer | 5 | 1× |
| dNTPs (2.0 mM) | 5 | 0.2 mM |
| 引物 F (10 μM) | 1.5 | 0.3 μM |
| 引物R (10 μM) | 1.5 | 0.3 μM |
| Template | Variable* | / |
| HS Taq (5U/μl) | 0.5 | 2.5U |
| Sulfolobus DNA polymerase IV | 1 | 1U |
| ddH ₂ O | Variable | / |
| 总体积 | 50 | / |

*DNA template 可参照如下标准 (50 μl PCR 体系):

| | |
|-----------|--------------|
| 人类基因组 DNA | 0.1 μg-1 μg |
| λDNA | 0.5 ng-5 ng |
| 质粒 DNA | 0.01 ng-1 ng |
| 大肠杆菌 DNA | 10 ng-100 ng |

PCR 条件如下

| | | |
|---------|--------|-------------|
| 95°C | 5 min | } 30 Cycles |
| 95°C | 15 sec | |
| 55~72°C | 20 sec | |
| 72°C | 60s/kb | |
| 72°C | 3 min | |