

Tli DNA聚合酶

| 组分 | #M0141 | #M0142 |
|--------------------------|--------|----------|
| Tli 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: Tli DNA聚合酶 (也被称为Vent DNA聚合酶) 是一种高保真的耐热DNA聚合酶, 其保真度比Taq DNA聚合酶高5-15倍^(1,2)。该酶具有高保真性的部分原因是由于其自身具有3'→5'核酸外切酶校读活性^(1,3)。在95°C温育1小时后, 该酶仍具有90%以上的聚合酶活性。

来源: Tli DNA聚合酶纯化自重组*E. coli*菌株, 该菌株携带有Tli DNA聚合酶基因⁽⁴⁾。

应用: 引物延伸、PCR反应。

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的反应体系包含1×反应缓冲液, MgSO₄ (补加或不补加), DNA模板, dNTPs, 引物和1-2 U的聚合酶。

1×反应缓冲液: 20mM 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:

核酸内切酶活性: 50 μl反应体系中, 20 U本酶与0.4 mM dNTPs和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. Mattila, P. et al. (1991) *Nucl. Acids Res.*, 19, 4967-4973.
2. Eckert, K.A. and Kunkel, T.A. (1991) *PCR Methods and Applications*, 1, 17-24.
3. Kong, H.M., Kucera, R.B. and Jack, W.E. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 1965-1975.
4. Perler, F. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5577-5581.

用Tli 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, Tli DNA聚合酶, 1-6 mM MgSO₄, 每种dNTP各200-400 μM和0.4 μM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, 特别是当使用有校读功能的DNA聚合酶时。对于有校读功能的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 (不同反应体积要相应地调整这个比例)。总体来说, 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: Tli DNA聚合酶1-2 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。通常, Tli DNA聚合酶的退火温度与其它DNA聚合酶所用的退火温度相同或稍高 (不同的聚合酶要求不同的退火温度, 可能是由于它们连接DNA的K_m值不同)。

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, Tli 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。

Tli 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 | |
| Tli DNA聚合酶* | 0.25-0.5 μ l | 0.5-1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 | |