

## *E. coli* DNA Polymerase I

产品编号	产品名称	包装
D7043S	<i>E. coli</i> DNA Polymerase I	250U
D7043M	<i>E. coli</i> DNA Polymerase I	1000U
D7043L	<i>E. coli</i> DNA Polymerase I	5000U

### 产品简介:

- 碧云天生产的*E. coli* DNA Polymerase I, 即大肠杆菌DNA聚合酶I, 是由碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种DNA模板依赖的DNA聚合酶, 可以在单链DNA模板和与其配对的引物存在的条件下, 催化5'→3'方向的DNA合成[1]。*E. coli* DNA Polymerase I同时还具备双链DNA缺刻(nick)处特异性的5'→3'外切酶活性、单链特异性的3'→5'外切酶活性以及核糖核酸酶H活性[2]。*E. coli* DNA Polymerase I的DNA合成酶活性和双链DNA缺刻(nick)处特异性的5'→3'外切酶活性, 可以实现缺刻处3'-OH起始的DNA合成和5'端单链DNA的降解, 实现缺口平移。*E. coli* DNA Polymerase I的单链特异性的3'→5'外切酶活性可以起到DNA合成的校验作用(proofreading)。在有dNTP存在的情况下, *E. coli* DNA Polymerase I更多地表现为DNA聚合酶活性; 而当dNTP不存在的情况下, *E. coli* DNA Polymerase I更多表现为单链特异性的外切酶活性, 例如可以表现为平末端双链DNA中的任一条链的5'端的5'→3'外切酶活性。
- E. coli* DNA Polymerase I的多功能性可实现以双链DNA中的缺刻或缺口为起点合成新的DNA链; 从缺口处降解与模板链互补的DNA链, 实现DNA的缺口平移; 保证DNA复制过程中错配的校对, 并对复制和修复中出现的空隙进行填补[3]。
- 碧云天生产的*E. coli* DNA Polymerase I补平双链DNA 5'突出末端(5' overhang)的效果参考图1。

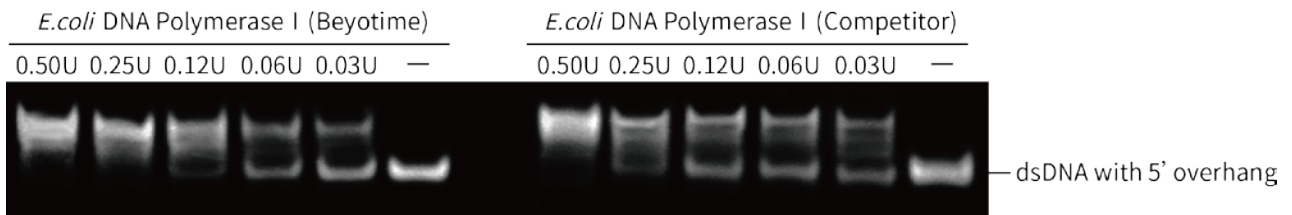


图1. 碧云天生产的*E. coli* DNA Polymerase I (D7043)补平双链DNA 5'突出末端(5' overhang)的效果图。在20μl反应体系中加入图中指定量的本产品或N公司(Competitor)的*E. coli* DNA Polymerase I, 37°C孵育20分钟进行反应, 反应完成后75°C孵育20分钟以终止反应。取出5μl反应产物, 加入1μl 6X DNA Loading Buffer (D0071), 然后进行15%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。180V电泳60分钟, 之后用Gel-Red (EB升级换代产品, 10000X) (D0139)室温染色5分钟, 在紫外灯下观察实验结果。如图所示, 本产品与N公司的产品相比, 具有类似的催化效果。反应体系(20μl): 10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 100μM dNTP Mix, 0.5μM dsDNA with 5' overhang (pH7.9 @ 25°C)。dsDNA with 5' overhang (也称具有5'突出末端的双链线性DNA)是使用Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (D0251)并按照该产品说明书推荐的程序, 把5'-ATACATAGATACATAGACTGGCCGTCGTTTTAC-3'和5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'这两条寡核苷酸链进行退火反应得到的产物, 并以此退火产物为底物, 进行双链DNA 5'突出末端的补平。实际操作时不同实验条件获得的实验结果会略有差异, 图中所示结果仅供参考。

- 碧云天生产的*E. coli* DNA Polymerase I对3'端带有氨基修饰的双链线性DNA消化(5'→3'外切酶活性)的效果参考图2。

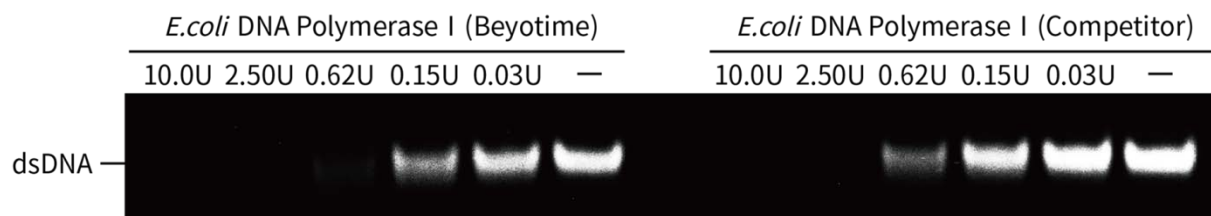


图2. 碧云天生产的*E. coli* DNA Polymerase I (D7043)对3'端带有氨基修饰的双链线性DNA消化(5'→3'外切酶活性)的效果图。在20μl反应体系中加入图中指定量的本产品或N公司(Competitor)的*E. coli* DNA Polymerase I, 37°C孵育20分钟进行反应, 反应完成后75°C孵育20分钟以终止反应。取出5μl反应产物, 加入1μl 6X DNA Loading Buffer (D0071), 然后进行15%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。180V电泳60分钟, 之后用Gel-Red (EB升级换代产品, 10000X) (D0139)室温染色5分钟, 在紫外灯下观察实验结果。如图所示, 本产品与N公司的产品相比, 具有类似的催化效果。反应体系(20μl): 10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0.5μM dsDNA。3'端带有氨基修饰的单链DNA不会被*E. coli* DNA Polymerase I的3'→5'外切酶活性所降解。3'端带

有氨基修饰的dsDNA是使用Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (D0251)并按照该产品说明书推荐的程序,把5'-ATACATAGATACATAGACTGGCCGTCGTTTTAC-3'NH<sub>2</sub>和5'-GTA AACGACGGCCAGTCTATGTATCTATGTAT-3'NH<sub>2</sub>这两条寡核苷酸链进行退火反应得到的产物,并以此退火产物为底物,进行双链线性DNA消化。实际操作时不同实验条件获得的实验结果会略有差异,图中所示结果仅供参考。

- **用途:** DNA合成;双链DNA 5'突出末端(5' overhang)的补平;双链DNA 3'突出末端(3' overhang)的削平;cDNA第二条链合成[4];与DNase I一起使用,进行DNA切口平移;DNA的切口翻译以获得具有高比活性的探针。
- **来源:** 纯化自携带编码*E.coli* DNA Polymerase I基因的*E.coli*重组菌株。
- **活性定义:** One unit is defined as the amount of enzyme that will incorporate 10nmol of dNTP into acid insoluble material in 30 minutes at 37°C.
- **纯度:** 不含除*E.coli* DNA Polymerase I之外的其它种类的DNA外切酶,不含内切酶,不含RNase。
- **酶储存液:** 25mM Tris-HCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 50% Glycerol (pH7.4 @25°C)。
- **10X Reaction Buffer:** 100mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT (pH7.9 @25°C)。
- **失活或抑制:** 75°C孵育20分钟可使*E.coli* DNA Polymerase I失活。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7043S-1	<i>E.coli</i> DNA Polymerase I (10U/μl)	25μl
D7043S-2	10X Reaction Buffer	100μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7043M-1	<i>E.coli</i> DNA Polymerase I (10U/μl)	100μl
D7043M-2	10X Reaction Buffer	400μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7043L-1	<i>E.coli</i> DNA Polymerase I (10U/μl)	500μl
D7043L-2	10X Reaction Buffer	2ml
—	说明书	1份

#### 保存条件:

-20°C保存,两年有效。

#### 注意事项:

- 由于*E.coli* DNA Polymerase I具有外切酶活性,在进行反应前应尽量避免环境温度偏高导致的DNA链被切除。
- *E.coli* DNA Polymerase I不具有内切酶活性,且本产品不包含DNase I,进行切口翻译反应时必须另外添加DNase I。
- 对*E.coli* DNA Polymerase I剧烈震荡或搅拌会使酶失活。
- *E.coli* DNA Polymerase I与DNA的亲合力较高,加入过量的酶易发生凝集作用(Aggregation),影响反应的进行。
- *E.coli* DNA Polymerase I可使用带修饰的核苷酸(例如生物素、地高辛、荧光标记核苷酸)作为DNA合成的底物,以用于DNA探针的标记。
- 酶使用时宜存放在冰盒内或冰浴上,使用完毕后宜立即放置于-20°C保存。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明:

##### 1. 双链DNA 5'突出末端(5' overhang)的补平:

a. 对于双链DNA 5'突出末端(5' overhang)的补平,参考下表在冰浴中配制反应体系(以20μl体系为例)。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-Free Water	(16-x)μl	-
dsDNA with 5' overhang	xμl	~0.5μM or 5-200ng/μl
10X Reaction Buffer	2μl	1X
dNTP Mix (2mM each)	1μl	100μM
<i>E.coli</i> DNA Polymerase I (10U/μl)	1μl	0.5U/μl
Total Volume	20μl	-

注1:在进行末端补平实验时可适当减少酶量,避免在外切酶活性的作用下导致模板的缺失。

注2: 如果同时进行多个反应, 可以把上表中除dsDNA with 5' overhang之外的所有溶液和酶提前混合, 分装到各反应管, 最后再加入dsDNA with 5' overhang。

注3: dsDNA with 5' overhang如果是寡核苷酸, 最终浓度可以约为0.5 $\mu$ M; 如果是消化后的DNA质粒等最终浓度可以约为5-200ng/ $\mu$ l。

- b. 按上表设置好反应体系后, 适当轻轻混匀反应体系, 随后低速离心以使粘附在管壁上的液体沉淀至管底。
- c. 反应条件: 37 $^{\circ}$ C孵育20分钟。注: 反应时间可以根据实际情况酌情适当调节。
- d. 终止反应: 75 $^{\circ}$ C孵育20分钟使*E.coli* DNA Polymerase I失去活性。

## 2. 双链线性DNA的消化:

- a. 对于双链线性DNA消化, 参考下表在冰浴中配制如下反应体系(以20 $\mu$ l体系为例)。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-Free Water	(17-x) $\mu$ l	-
dsDNA	x $\mu$ l	~0.5 $\mu$ M or 5-200ng/ $\mu$ l
10X Reaction Buffer	2 $\mu$ l	1X
<i>E.coli</i> DNA Polymerase I (10U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	0.5U/ $\mu$ l
Total Volume	20 $\mu$ l	-

注: 如果同时进行多个反应, 可以把上表中除dsDNA之外的所有溶液和酶提前混合, 分装到各反应管, 最后再加入dsDNA。

- b. 按上表设置好反应体系后, 适当轻轻混匀反应体系, 随后低速离心以使粘附在管壁上的液体沉淀至管底。
- c. 反应条件: 37 $^{\circ}$ C孵育20分钟。注: 反应时间可以根据实际情况酌情适当调节。
- d. 终止反应: 75 $^{\circ}$ C孵育20分钟使*E.coli* DNA Polymerase I失去活性。

## 3. 其它用途可以参考适当的文献资料进行。

### 常见问题:

1. *E.coli* DNA Polymerase I能补平3'突出末端吗?  
不能, *E.coli* DNA Polymerase I只能通过移除3'突出末端的方式形成平末端。*E.coli* DNA Polymerase I (D7043)、Klenow Fragment (D7037)、T4 DNA Polymerase(D7052)是削平3'突出末端的最佳选择。
2. *E.coli* DNA Polymerase I能补平DNA的5'突出末端吗?  
可以, 5'突出末端会被补平, 3'突出末端会被削平。Klenow Fragment (D7037)缺乏5' $\rightarrow$ 3'外切酶活性, 是补平DNA的5'突出末端的首选酶。
3. *E.coli* DNA Polymerase I能用于切口平移实验吗?  
能, 切口平移实验是该酶的重要应用之一。
4. 切口平移实验时有温度要求吗?  
切口平移时的孵育温度应低于20 $^{\circ}$ C。在较高的温度下, 新合成的链可以分离并被复制。
5. *E.coli* DNA Polymerase I可以热失活吗?  
可以。反应结束后添加10mM EDTA螯合Mg<sup>2+</sup>, 当温度升高时, 可以保护DNA末端, 然后在75 $^{\circ}$ C加热20分钟即可将酶灭活。
6. *E.coli* DNA Polymerase I能移除5'突出末端吗?  
不能, *E.coli* DNA Polymerase I的5' $\rightarrow$ 3'外切酶活性仅适用于双链DNA缺刻处。
7. DNA切口平移能够用来做标记探针吗?  
可以, DNA聚合酶I用5' $\rightarrow$ 3'核酸外切酶去除缺口处的前导碱基, 并用标记的碱基填充。该方法适于制作大而均匀的探针, 但比活性不高。

### 参考文献:

1. Kunkel TA, Loeb LA, Goodman MF. J Biol Chem. 1984. 259(3):1539-45.
2. Green MR, Sambrook J. Cold Spring Harb Protoc. 2020. 2020(5):100743.
3. Yu H, Chao J, Patek D, Muiumdar R, Muiumdar S, Waggoner AS. Nucleic Acids Res. 1994. 22(15):3226-32.
4. D'Alessio JM, Gerard GF. Nucleic Acids Res. 1988. 16(5):1999-2014.

### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7006	T4 DNA Ligase	40,000U
D7008	T4 DNA Ligase	200,000U
D7035	Klenow Fragment	100U
D7037S	Klenow Fragment	200U
D7037M	Klenow Fragment	1000U
D7037L	Klenow Fragment	5000U
D7053S	phi29 DNA Polymerase	250U

D7053M	phi29 DNA Polymerase	1kU
D7053L	phi29 DNA Polymerase	5kU
D7053XL	phi29 DNA Polymerase	20kU
D7039	Klenow Fragment, Exo-	100U
D7041S	Klenow Fragment, Exo-	200U
D7041M	Klenow Fragment, Exo-	1000U
D7041L	Klenow Fragment, Exo-	5000U
D7043S	<i>E.coli</i> DNA Polymerase I	250U
D7043M	<i>E.coli</i> DNA Polymerase I	1000U
D7043L	<i>E.coli</i> DNA Polymerase I	5000U
D7051	T4 DNA Polymerase	50U
D7052S	T4 DNA Polymerase	150U
D7052M	T4 DNA Polymerase	750U
D7052L	T4 DNA Polymerase	3kU
D7096	T4 Polynucleotide Kinase	100U
D7160S	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	10KU
D7160M	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	50KU
D7160L	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	200KU
D7176S	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	10KU
D7176M	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	50KU
D7176L	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	200KU
D7213S	BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase	200U
D7213M	BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase	1000U
D7215S	BeyoAmp™ Plus Extra-long DNA Polymerase	200U
D7215M	BeyoAmp™ Plus Extra-long DNA Polymerase	1000U
D7220	BeyoFusion™ DNA Polymerase	200U
D7221	BeyoFusion™ DNA Polymerase	1000U
D7371	dNTP Mixture (2.5mM each)	1ml
D7373	dNTP Mixture (25mM each)	250µl

Version 2023.05.04