

T4 DNA Polymerase

(Bakteriophage T4 aus *Escherichia coli*)

T4 DNA Polymerase (Bakteriophage T4 aus *Escherichia coli*)

Artikel Nr.	Größe
E1100-01	200 Einheiten
E1100-02	1 000 Einheiten

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, das erforderlich ist, um 10 nmol Nukleotide in 30 Minuten bei 37°C in die säureunlösliche Form zu überführen.

Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°C

T4 DNA-Polymerase ist eine mesophile Polymerase, die eine sehr starke 3'→5' Exonuklease-Aktivität besitzt.

Beschreibung:

- Besitzt 5' → 3' Polymerase und 3' → 5' Exonuklease-Aktivität (1, 2).
- Fügt markierte Nukleotide an zurückgesetzte (recessed) 3'-Enden von DNA-Fragmenten an.
- Die Polymerase benötigt einen Primer sowie einzelsträngige DNA als Vorlage (template).
- Die Exonuklease-Aktivität der T4 DNA Polymerase ist im Vergleich zu DNA Polymerase I stärker ausgeprägt. Sie besitzt eine größere Aktivität gegenüber einzelsträngiger als zu doppelsträngiger DNA.
- Ultrareines rekombinantes Enzym.
- Exonuklease-Tätigkeit kann verwendet werden, um eines oder wenige Nukleotide von 3'-Ende der doppelsträngigen DNA zu entfernen.
- Das Enzym ist geeignet für:
 - > die Entfernung von 3'-Überhängen zur Erzeugung stumpfer Enden (blunt ends) (3, 4).
 - > 5'-Einfügung von Nukleotiden zur Erzeugung stumpfer Enden (blunt ends) (3,4)
 - > Markierung von Proben durch Strangersetzungssynthese (replacement synthesis) (3,4)
 - > Subklonierung nach Einzelstrangdeletion (5)
 - > Synthese eines zweiten Stranges in punktspezifischer Mutagenese (site-directed mutagenesis) (6)

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

20 mM Kalium-Phosphat (pH 6.5), 5 mM Dithiothreitol und 50 % [v/v] Glycerin.

Reaktionsbedingungen der Qualitätskontrolle:

67 mM Tris-HCl (pH 8.8 bei 22°C), 6.7 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 16.6 mM Ammonium-Sulfat, 6.7 µM EDTA, 20 µg Rinderserum-Albumin, 45 µg aktivierte Kalb-Thymus-DNA und 0.033 mM jeweils dCTP, dGTP, dTTP und [α -³²P] dATP. Inkubation bei 37°C für 30 Minuten in einem Reaktionsvolumen von 100 µl (1).

Qualitätskontrolle:

Qualitätskontrolle: Alle Chargen werden auf Endonuklease-Aktivität geprüft.

Literatur:

1. Goulian, M., Lucas, Z.J. und Kornberg, A. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 627-638.
2. Lehman, I.R. (1981) *Enzymes* 14, 51-65.
3. Tabor, S. und Struhl, K (1989) in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M., et al., Hrsg.) pp. 3.5.10-3.5.12, John Wiley&Sons, New York.
4. Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition*, pp. 5.44-5.47, Cold Spring Harbour.
5. Dale, R., McClure, B. und Houchins, J., (1985) *Plasmid* 13, 31-40.
6. Kunkel, T. A., Roberts, J. D. und Zakour, R. A. (1987) *Methods Enzymol.* 154, 367-382.