

描述: Equi-phi29 DNA Polymerase 是 phi29 的改造体, 并经多次纯化分离而得。在保留了 phi29 DNA 聚合酶的链置换、连续合成特性 (>70kb) 的基础上, 提高了滚环扩增的反应温度, 该酶可以在 42 度条件下持续的进行 DNA 合成 (而 phi29 DNA 聚合酶在此温度下反应活性很低)。

这种高温的反应特性, 在以下几个方面对实验有明显的提升: (1) 在 NGS 测序中, 其提升了高 GC 含量、回文结构等复杂模板的延伸能力, 使得 NGS 的覆盖度更均一, 降低测序所需深度; (2) 高温的反应条件, 提升了基因组 DNA 的 WGA 产物的合成量, 并可以进行变温扩增; (3) 降低测序中 Gap 区域, 提升单细胞测序的数据质量和完整度; (4) 降低非特异性扩增产物; (5) 提升 MDA/RCA 等实验的扩增性能和特异性。

除此外, 该酶仍然具有很强的 3'→5'外切酶校读功能, 合成的 DNA 片段保真性高。该酶的外切酶活性较强, 因此合成过程中引物需要 3'端硫代修饰, 以降低外切活性对引物的切割效应。

组分

名称	1000U	10KU
Equi-phi29 DNA Polymerase (10 U/μl)	100 μl	1ml
10xphi29 Buffer	1 ml	1 mlx3

储存: -20°C可保存 3 年。

使用方法

1. 配制引物模板退火体系

10xphi29 Buffer	2 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	1.2 μl
Template DNA	0.1-40 ng
硫代修饰的Oligo	x μl
ddH ₂ O Upto	19 μl

注意: 在不同的实验类型中, Oligo根据实验需要自行选择。

2. 引物和模板退火: 体系配制完毕后, 放置到 PCR 仪中, 95°C 3min, 25°C 3min。

3. 退火完毕后, 向退火产物中加入 1μl Equi-phi29 DNA Polymerase, 混合均匀。

4. 扩增反应

4.1 恒温扩增

对于环状 DNA 模板采用恒温反应作为推荐使用 30°C 恒温扩增, 30°C 孵育 6~16h。该酶在 30-42°C 条件下均可工作, 必要时根据实验类型进行调整。

4.2 变温扩增

对于基因组 DNA 或 cDNA 模板, 推荐使用变温扩增反应, 以在短时间内获得更高产量, 并提高了低浓度模板的扩增产量。在 PCR 仪上做如下设置:

【30°C 5min; 42°C 15s】循环 72 次 (约 6h) 或 120 次 (约 10h)。

必要时, 反应结束后, 可于 65°C 10min 进行失活反应。

使用注意事项

(1) 必要时可单独额外添加终浓度 1 mM DTT 和 0.2 mg/ml BSA, 可提高反应效率。

(2) 该酶的最佳反应温度为 42 °C (在 30~42°C 之间均有活性)。

(3) 65°C 10min 即可使该酶失活。

(4) 根据实验类型需要, 调整 dNTP 的浓度 100~500 μM。

(5) 添加 Yeast Pyrophosphatase (货号: C5006) 可提高 DNA 产量。

(6) 反应引物 3'端的硫代修饰可避免引物降解。