

Poly (A) Polymerase

使用说明书

TaKaRa Code : D2180A

包装

Poly(A) Polymerase (0.2~2.0 U/ μ l)	20 Units
10 \times Poly(A) Polymerase Buffer	1 ml
10 mM DTT	1 ml
25 mM MnCl ₂	1 ml
0.1% BSA*	500 μ l
100 mM ATP	8 μ l

* BSA在-20°C下易产生沉淀，应尽量避免多次反复冻融。短期使用请在4°C下保存。产生稍许沉淀不影响反应效果。

保存：-20°C

制品说明

本酶催化在各种多聚核糖核酸的3'末端聚合A碱基的反应。能以单链RNA作引物，双链RNA以及合成的多聚核苷酸、短的寡聚核苷酸等不宜作引物；DNA也不能作引物。本酶因聚合AMP碱基，故只能用ATP作底物，ADP、dATP均不能作为底物。另外，UTP、CTP的掺入不足ATP的5%，而GTP也不能作为底物进行聚合。

酶贮存溶液

Tris-HCl (pH7.9)	25 mM
NaCl	500 mM
EDTA	1 mM
DTT	0.1 mM
Glycerol	50 %

起源

Escherichia coli B

活性定义

以ATP为底物，在37°C、pH7.9的条件下，10分钟内把1 nmol的AMP聚合到引物上所需要的酶量定义为1个活性单位(U)。

纯度

2 U的本酶和1 μ g的16S, 23S rRNA在37°C下反应16小时，RNA的电泳谱带不发生变化。

用途

- 在RNA上加上Poly(A)尾。
- RNA的3'末端标记。

使用注意

由于MnCl₂与MgCl₂共存时，反应液会变成淡红色，长时间放置易出现沉淀，因此MnCl₂须在反应前加入。

添附Buffer组成 (保存：-20°C)

10 \times Poly(A) Polymerase Buffer	
Tris-HCl (pH7.9)	500 mM
MgCl ₂	100 mM
NaCl	2500 mM

使用例

在RNA上加上Poly(A)尾

- 在微量离心管中配制下列反应液。

10 \times Poly(A) Polymerase Buffer	5 μ l
MnCl ₂	5 μ l
DTT	5 μ l
0.1% BSA	10 μ l
ATP	0.5 μ l
RNA	10 μ M
Poly(A) Polymerase (0.2 ~ 2 U/ μ l)	5 U
dH ₂ O	up to 50 μ l

- 37°C反应30分钟。
- 加入50 μ l (等量) 的苯酚/氯仿/异戊醇 (25 : 24 : 1)，充分混匀。
- 离心，取上层 (水层) 移至另一微量离心管中。
- 加入50 μ l (等量) 的氯仿/异戊醇 (24 : 1)，充分混匀。
- 离心，取上层 (水层) 移至另一微量离心管中。
- 加入5 μ l (1/10量) 的3 M NaOAc (pH5.2)。
- 加入125 μ l (2.5倍量) 的冷无水乙醇，-20°C放置30~60分钟。
- 离心回收沉淀，用70%的冷乙醇清洗沉淀，真空干燥。
- 用于以后实验。
- 注) 如需得到高纯度的Poly(A)RNA时，可以在操作2.后用Oligo(dT)-Cellulose层析进行纯化。

ATP的掺入个数和时间的关系

以1 mM ATP作底物，15 U的Poly(A) Polymerase作用于84 μ g RNA所得到的结果如下：

反应时间 (分钟)	0	5	10	30	60
Poly(A) bases	0	10	20	40	75