

## Recombinant *E.coli* RecA Protein

产品编号	产品名称	包装
D7025S	Recombinant <i>E.coli</i> RecA Protein	200µg
D7025M	Recombinant <i>E.coli</i> RecA Protein	1mg

### 产品简介:

- 碧云天生产的Recombinant *E.coli* RecA Protein, 即重组大肠杆菌RecA蛋白, 也称*E.coli* RecA, 是碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种大肠杆菌内源性表达的对于DNA损伤修复和紫外诱导的突变过程中的遗传重组起关键作用的酶。RecA的合成是由DNA损伤导致的SOS反应诱导的。RecA具有单链DNA依赖的ATP酶活性, 在同源重组反应的过程中, 会形成D-loop和Holliday structure; 它还具有coprotease活性, 并促进LexA抑制子、lambda噬菌体抑制子和UmuD蛋白的自剪切。RecA在真核生物中的同源蛋白是Rad51和Dmcl1[1]。*E.coli* RecA蛋白可用于重组酶聚合酶扩增(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)[2]。
- 体外研究所必需的表明, 在ATP存在的情况下, *E.coli* RecA蛋白首先与单链DNA结合形成核蛋白丝, 核蛋白丝与双链DNA结合形成突触丝, 突触丝打开双链体并寻找同源链, 之后催化互补链的交换, 结合*E.coli* RecA蛋白的单链DNA与互补链DNA从5'→3'方向进行互补配对最终形成新的同源双链体并发生分叉迁移[3]。
- **用途:** 电镜下DNA结构的可视化, D-loop突变, 利用*E.coli* RecA蛋白结合的探针进行DNA文库筛选, 在单个指定位点进行DNA酶切, 介导全长cDNA克隆的亲亲和捕获, 同源重组机制及SOS反应研究, 重组酶聚合酶扩增。
- **来源:** 纯化自携带*recA*基因的*E.coli*重组菌株。
- **分子量:** 约为38kDa。
- **纯度:** 纯度≥ 95%, 且不含DNA内切酶和外切酶、不含RNA酶、不含磷酸酯酶。
- **浓度:** 2mg/ml。
- **酶储存溶液:** 10 mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% (v/v) Glycerol, pH7.4 @ 25°C。
- **10X RecA Reaction Buffer:** 700mM Tris-HCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT, pH7.6 @ 25°C。
- **失活或抑制:** 65°C孵育20分钟可使*E.coli* RecA蛋白失活。
- 碧云天*E.coli* RecA蛋白酶活性检测结果参考图1。

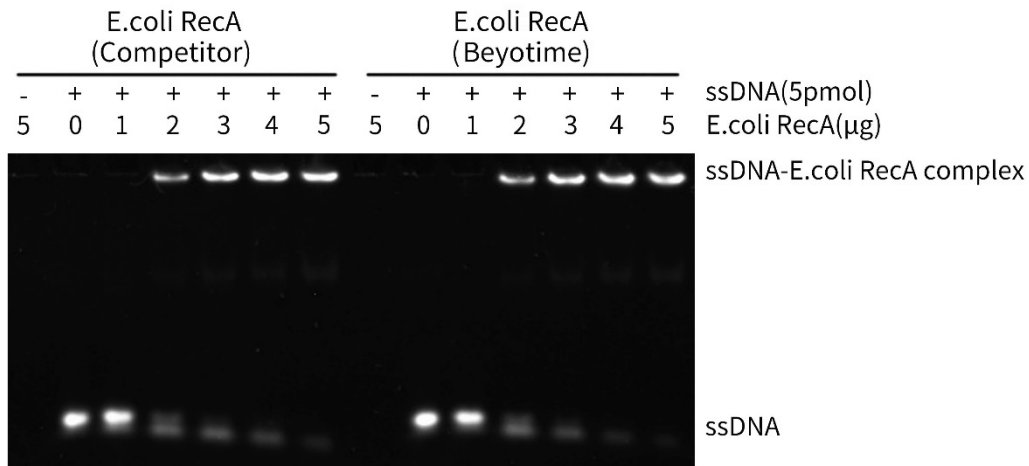


图1. 碧云天Recombinant *E.coli* RecA Protein (D7025)活性鉴定结果图。在10µl反应体系中, 加入1µl 10X RecA Reaction Buffer、图中指定量的本产品(0-5µg)及5pmol ssDNA (25bp), 随后用超纯水补足至10µl, 37°C孵育30分钟进行充分结合。结合完成后, 取10µl反应后产物, 加入1µl EMSA/Gel-Shift上样缓冲液(蓝色, 10X) (GS007)混匀, 使用BeyoGel™ EMSA PAGE预制胶(4%, 15孔) (GS306S)进行电泳检测。电泳结束后, 在室温下使用NA-Red (EB升级换代产品, 2000X) (D0128/D0130)染色凝胶20-30分钟, 紫外灯下拍照观察实验结果。如图所示, 本产品与N公司(Competitor)有相似的单链DNA结合活性。实际效果会因样品种类、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7025S-1	Recombinant <i>E.coli</i> RecA Protein (2µg/µl)	100µl

D7025S-2	10X RecA Reaction Buffer	0.2ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7025M-1	Recombinant <i>E.coli</i> RecA Protein (2µg/µl)	500µl
D7025M-2	10X RecA Reaction Buffer	1ml
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20°C保存，两年有效。

### 注意事项：

- 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. 单链DNA结合实验

- E.coli* RecA蛋白为基因重组的重要蛋白，在基因重组开始时，*E.coli* RecA蛋白首先与单链DNA结合形成核蛋白质丝，如需检验*E.coli* RecA蛋白与单链DNA的结合情况，可参考如下步骤进行。
- 按照下表配制反应体系。

Reagent	Volume
Ultrapure Water	xµl
10X RecA Reaction Buffer	1µl
ssDNA	yµl
<i>E.coli</i> RecA	1-2µl
Total Volume	10µl

注1：建议最后添加*E.coli* RecA蛋白。

注2：请在冰浴上配制反应体系。

注3：如需摸索或调整*E.coli* RecA蛋白的使用量，可配制10 mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% (v/v) Glycerol, pH7.4 @ 25°C储存液，并用其对*E.coli* RecA蛋白进行稀释后再添加。

注4：ssDNA的用量可按照*E.coli* RecA蛋白与ssDNA的摩尔比为25:1左右进行调整和尝试。

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，随后低速离心以使粘附在管壁上的液体聚集于管底。
- 反应条件：37°C孵育30分钟。
  - 保持恒温，否则会影响ssDNA与*E.coli* RecA蛋白的结合效率。
  - 反应时间可以根据实际情况酌情适当调节。
- 在反应产物中按比例加入EMSA上样缓冲液推荐使用碧云天生产的EMSA/Gel-Shift上样缓冲液(无色，10X) (GS006)或EMSA/Gel-Shift上样缓冲液(蓝色，10X) (GS007)。
- 将反应后产物进行EMSA PAGE凝胶电泳。推荐使用碧云天生产的BeyoGel™系列EMSA PAGE预制胶(GS301S/GS302S)或EMSA PAGE凝胶配制试剂盒(GS298S)。
 

注：在正式电泳前，推荐在100V条件下，预电泳30分钟，随后上样，在冰浴上使用200-300V电压进行电泳，直至样品中的溴酚蓝电泳至凝胶的2/3位置处时，可停止电泳。
- 使用碧云天生产的NA-Red (EB升级换代产品, 2000X) (D0128/D0130)对凝胶进行染色，约20-30分钟后，即可在紫外灯下拍照观察，分析*E.coli* RecA蛋白与ssDNA的结合效果。

#### 2. 单链-双链DNA结合实验

- E.coli* RecA蛋白在与单链DNA结合形成复合物后，复合物结合双链DNA形成稳定的三螺旋结构，并寻找与单链DNA互补的序列，如需检验复合物与双链DNA的结合情况，可参考如下步骤进行。
- 按照下表配制反应体系(以pUC19载体为例，ssDNA设计为靶向pUC19的374bp处的HpyCH4IV酶切位点)。

Reagent	Volume
Ultrapure Water	xµl
10X RecA Reaction Buffer	4µl
ssDNA (60 mer)	0.18µg
pUC19	0.5pmol
ATP γ-S	0.3mM
<i>E.coli</i> RecA	2µl
Total Reaction Volume	40µl

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，随后低速离心以使粘附在管壁上的液体聚集于管底。

- d. 将混合物置于37°C孵育10分钟以形成稳定的三螺旋结构，三螺旋体可在0.3mM ATP  $\gamma$ -S存在的情况下用于其他应用(如DNA链置换)。
- e. 三螺旋结构可阻断pUC19载体上374bp处HpyCH4IV位点的甲基化。向反应体系中添加8U SssI (含160 $\mu$ M SAM)，37°C进行甲基化反应10分钟，对未保护的位点进行甲基化。
- f. 65°C孵育15分钟，停止反应，破坏三螺旋结构。
- g. 向反应体系中加入10U HpyCH4IV，37°C消化20分钟。
- h. 向反应体系中加入8 $\mu$ l DNA上样缓冲液(6X) (D0071)，然后使用1%琼脂糖凝胶进行电泳分析。pUC19发生线性化(线性化比例超过90%)，即确定三螺旋结构形成。

3. 其它用途请自行根据实验目的，查阅相关文献资料进行。

#### 参考文献：

1. Yao Y,Li X,Chen W, et al. Front Plant Sci. 2020, 11:839.
2. Olaf Piepenburg, Colin H, WilliamsNiall A, ArmesDerek L, Stemple. Recombinase polymerase amplification. US8574846B2 [P]. 2013.
3. Del Val E, Nasser W, Abaibou H, Reverchon S. Biochem Soc Trans. 2019. 47(5):1511-1531.

#### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D7035	Klenow Fragment	100U
D7037S	Klenow Fragment	200U
D7037M	Klenow Fragment	1000U
D7037L	Klenow Fragment	5000U
D7039	Klenow Fragment, Exo-	100U
D7041S	Klenow Fragment, Exo-	200U
D7041M	Klenow Fragment, Exo-	1000U
D7041L	Klenow Fragment, Exo-	5000U
D7055S	<i>Bsu</i> DNA Polymerase, Large Fragment	200U
D7055M	<i>Bsu</i> DNA Polymerase, Large Fragment	1000U
D7057S	T4 Gene 32 Protein (ssDNA结合蛋白)	100 $\mu$ g
D7057M	T4 Gene 32 Protein (ssDNA结合蛋白)	500 $\mu$ g
D7057L	T4 Gene 32 Protein (ssDNA结合蛋白)	2mg
D7378-250 $\mu$ l	ATP (100mM, Nuclease free)	250 $\mu$ l
D7378-1ml	ATP (100mM, Nuclease free)	1ml
D7378-5ml	ATP (100mM, Nuclease free)	5ml
D7024S	<i>E.coli</i> Single-Stranded DNA Binding Protein (SSB)	100 $\mu$ g
D7024M	<i>E.coli</i> Single-Stranded DNA Binding Protein (SSB)	500 $\mu$ g
D7024L	<i>E.coli</i> Single-Stranded DNA Binding Protein (SSB)	2mg
D7025S	Recombinant <i>E.coli</i> RecA Protein	200 $\mu$ g
D7025M	Recombinant <i>E.coli</i> RecA Protein	1mg
P7415 -100 $\mu$ g	Recombinant SSB	100 $\mu$ g
P7415-500 $\mu$ g	Recombinant SSB	500 $\mu$ g

Version 2024.09.09