

Bsu DNA Polymerase, Large Fragment

产品编号	产品名称	包装
D7055S	<i>Bsu</i> DNA Polymerase, Large Fragment	200U
D7055M	<i>Bsu</i> DNA Polymerase, Large Fragment	1000U

产品简介:

- 碧云天生产的*Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment, 即枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, *Bsu*) DNA聚合酶大片段, 具有5'→3' DNA聚合酶活性, 不具有3'→5'和5'→3'的核酸外切酶活性。*Bsu* DNA聚合酶大片段具有链置换(Strand displacement)活性, 常用于重组酶聚合酶扩增(Recombinase Polymerase Amplification, RPA), 其等温扩增(Isothermal amplification)的温度通常为37°C。
- *Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment是将枯草芽孢杆菌DNA聚合酶I的5'→3'核酸外切酶结构域(1-296 aa)删除后表达剩余蛋白序列而获得。该酶保留了枯草芽孢杆菌DNA聚合酶I的5'→3'聚合酶活性, 但缺失了5'→3'核酸外切酶和3'→5'核酸外切酶活性。
- 重组酶聚合酶扩增(RPA)主要包括以下几个组分: 重组酶(Recombinase) T4 UvsX, 重组酶载入因子(Recombinase loading factor) T4 UvsY, *Bsu* DNA聚合酶大片段以及单链DNA结合蛋白(Single-strand binding protein) T4 gp32。在ATP存在的情况下, UvsX与引物相结合, 扫描DNA模板, 寻找与引物配对的核酸序列, 一旦引物被定位到了DNA模板的同源序列, ATP水解产生ADP, ADP与UvsX的结合导致UvsX被gp32取代而从DNA模板上解离下来, gp32作为单链结合蛋白可以稳定被置换的DNA链的结构, *Bsu* DNA聚合酶大片段因引物与DNA模板的配对而进行引物的延伸和模板的扩增。重组酶载入因子T4 UvsY和拥挤试剂(Crowding reagent) Carbowax20M的加入有利于UvsX与引物的结合, 即有利于重组酶UvsX的载入。
- 碧云天生产的*Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment催化延伸DNA模板的效果请参考图1。

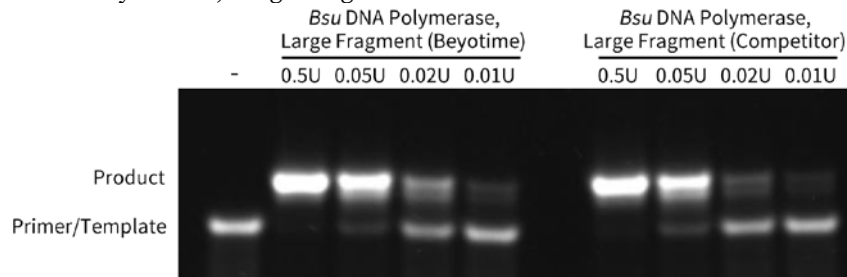


图1. 碧云天生产的*Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment (D7055)催化延伸DNA模板的效果图。使用本产品或竞争(Competitor) N公司的*Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment, 在20 μ l反应体系中加入图中指定量的本产品或N公司的*Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment, 37°C孵育15min进行反应。反应完毕后冰浴3-5min, 75°C孵育20min以终止反应。取出5 μ l反应液, 加入1 μ l 6X DNA Loading Buffer, 然后进行15%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(180V电泳60min); 之后用Gel-Red (D0140)室温染色15min, 然后进行拍照记录。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(20 μ l): 10mM Tris-HCl (pH7.9 at 25°C), 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 125 μ M dNTP Mix, 0.5 μ M Template/Primer (Template: 5'-ATACATAGATACATAGACTGGCCGTCGTTTTAC-3' / Primer: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'); Primer和Template按照D0251产品说明书中推荐的程序进行退火反应, 之后以Primer/Template退火产物为底物, 进行DNA模板的延伸。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*Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment在RPA反应中的作用效果请参考图2。

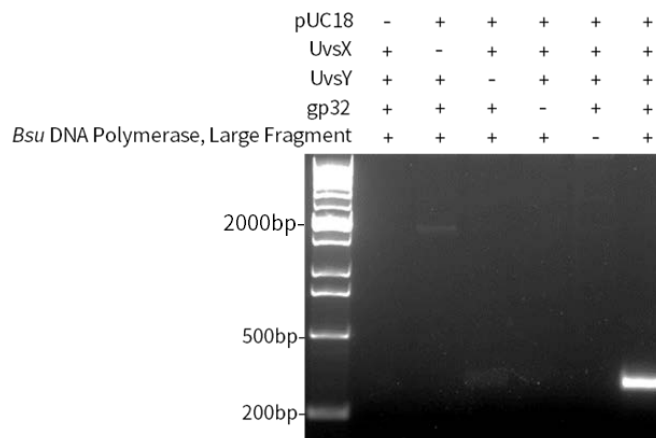


图2. 碧云天 *Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment (D7055)在RPA反应中的作用效果图。以pUC18为模板, 使用正向引物Primer-F (5'-AGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCC-3')和反向引物Primer-R (5'-TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGA TAACA-3')进行RPA反应。配制50μl反应体系: 包含缓冲液, dNTPs, pUC18, Primer-F, Primer-R, UvsX (D7059), UvsY (D7061), gp32 (D7057), 0.4U/μl *Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment (D7055)。设置无pUC18的阴性对照, 以及无UvsX、无UvsY、无gp32和无*Bsu* DNA polymerase, Large Fragment的对照。配制好反应体系后, 最后统一将Mg(Ac)₂加到管壁上, 离心以启动反应, 39°C孵育30分钟, 随后60°C加热10分钟。反应结束后离心, 从每管取出4μl样品, 分别加入0.8μl DNA上样缓冲液(6X) (D0071), 然后电泳并进行核酸染色和荧光成像分析, 产物为长度为293bp的片段。结果表明UvsX、gp32、*Bsu* DNA polymerase, Large Fragment对于RPA反应都是必需的。当体系中不含UvsY时, 可以观察到微弱的条带, 说明UvsY可以提高RPA反应的效率。实际效果会因样品种类、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **用途:** RPA法等温扩增; RPA链置换的DNA合成; 随机引物法标记; cDNA第二条链合成; 单个dA的加尾。
- **来源:** 大肠杆菌表达枯草芽孢杆菌DNA聚合酶I基因(297-880 aa)获得的重组蛋白。
- **活性定义:** One unit is defined as the amount of enzyme that will incorporate 10 nmol dNTPs into acid insoluble material in 30 minutes at 37°C.
- **纯度:** 不含DNA内切酶和外切酶, 不含核糖核酸酶。
- **酶储存液:** 25mM Tris-HCl (pH7.4), 50mM NaCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 50% (v/v) Glycerol.
- **10X Reaction Buffer:** 100mM Tris-HCl (pH7.9 at 25°C), 500mM NaCl, 100mM MgCl₂, 10mM DTT.
- **失活或抑制:** 75°C孵育20min。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7055S-1	<i>Bsu</i> DNA Polymerase, Large Fragment (5U/μl)	40μl
D7055S-2	10X <i>Bsu</i> Reaction Buffer	100μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7055M-1	<i>Bsu</i> DNA Polymerase, Large Fragment (5U/μl)	200μl
D7055M-2	10X <i>Bsu</i> Reaction Buffer	500μl
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存。

注意事项:

- 由于缺乏3'→5'核酸外切酶活性, *Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment不能切除3'未配对的突出末端, 因而不适用于产生平末端。
- *Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment 25°C时仍保留50%的DNA聚合酶活性, 是相同温度下Klenow片段(3'→5' exo-)活力的两倍。
- 配制RPA反应体系时, 会出现白色沉淀, 属于正常现象, 不影响实验结果。
- 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. *Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment催化延伸DNA模板。

a. Primer/Template杂合双链的退火。

将单链Primer和DNA Template等摩尔数混合, 推荐的终浓度为10μM, 90°C孵育1min, 然后通过梯度降温至25°C退火形成Primer/Template杂交双链。推荐使用碧云天生产的D0251 Annealing Buffer for DNA Oligos (5X), 并按照该产品使用说明进行退火反应。退火后的双链可以直接用于后续实验, 或在-20°C保存备用。

b. 对于DNA模板链的延伸, 参考下表在冰浴中配制反应体系。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-Free Water	15μl	-
Annealed Primer/template (10μM each)	1μl	0.5μM each
<i>Bsu</i> Reaction Buffer (10X)	2μl	1X
dNTP Mix (2.5mM each)	1μl	125μM
<i>Bsu</i> DNA Polymerase, Large Fragment (5U/μl)	1μl	0.25U/μl
Total Volume	20μl	-

注: 如果同时进行多个反应, 可把上表中除Annealed Primer/template之外的所有组分预先混合, 然后再分装到各反应

管。

- c. **反应条件:** 37°C孵育适当时间。参考图1, 其中的孵育时间为15min。该酶延伸速率预计和常规DNA聚合酶类似, 大约1000bp/分钟。具体使用时需要适当摸索孵育时间, 以确定比较合适的延伸时间。
- d. **终止反应:** 75°C孵育20min以终止反应。

2. ***Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment 进行RPA等温扩增请自行参考相关文献资料进行。**

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7050S	Bst DNA Polymerase, Large Fragment	800U
D7050M	Bst DNA Polymerase, Large Fragment	4000U
D7053S	phi29 DNA Polymerase	250U
D7053M	phi29 DNA Polymerase	1kU
D7053L	phi29 DNA Polymerase	5kU
D7053XL	phi29 DNA Polymerase	20kU
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)	100µg
D7057M	T4 Gene 32 Protein (ssDNA结合蛋白)	500µg
D7057L	T4 Gene 32 Protein (ssDNA结合蛋白)	2mg
D7059S	T4 UvsX Recombinase	100µg
D7059M	T4 UvsX Recombinase	500µg
D7059L	T4 UvsX Recombinase	2mg
D7061S	T4 UvsY Protein	100µg
D7061M	T4 UvsY Protein	500µg
D7061L	T4 UvsY Protein	2mg
D7359-250µl	dUTP (100mM)	250µl
D7359-1ml	dUTP (100mM)	1ml
D7360S	Uracil-DNA Glycosylase (<i>E. coli</i>)	1000U
D7360M	Uracil-DNA Glycosylase (<i>E. coli</i>)	5000U
D7362S	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Bacterium)	100U
D7362M	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Bacterium)	500U
D7364S	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Cod)	200U
D7364M	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Cod)	1000U
D7364L	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Cod)	5000U
D7371	dNTP Mixture (2.5mM each)	1ml
D7373	dNTP Mixture (25mM each)	250µl
D7376-1ml	dNTP/dUTP Mixture (2.5mM each/5mM)	1ml
D7376-5ml	dNTP/dUTP Mixture (2.5mM each/5mM)	5ml
D7378-250µl	ATP (100mM, Nuclease free)	250µl
D7378-1ml	ATP (100mM, Nuclease free)	1ml
D7378-5ml	ATP (100mM, Nuclease free)	5ml
ST043-1g	DTT	1g
ST483	PEG8000	500g
ST1483-100g	乙酸镁四水合物(99%, Reagent grade)	100g
ST1483-500g	乙酸镁四水合物(99%, Reagent grade)	500g
ST1591-50g	乙酸钾(≥99.0%, Reagent grade)	50g
ST1591-250g	乙酸钾(≥99.0%, Reagent grade)	250g
ST1591-1kg	乙酸钾(≥99.0%, Reagent grade)	1kg

Version 2024.01.16