

描述: G5U High-Fidelity DNA Polymerase, 融合 Q5 和 Q5U 的性能于一体, 使其成为一酶多用的全能选手。该酶来源于高保真 DNA 聚合酶, 并加入了增强的延伸结构, 使其具有超保真性能 (与 Q5 同水平)、长片段扩增能力、高产量、dUTP 渗入能力、扩增含有尿嘧啶模板的能力。使用该酶可轻松扩增 8kb 的基因组 DNA、20kb 的 λDNA。该酶具有 2kb/min 的延伸速度, 强 3'-5' 的外切酶活性 (280xTaq 酶保真度), 产物为平末端。

许多有高保真功能的聚合酶为 B 型 DNA 聚合酶, 在遇到 DNA 模板中的尿嘧啶碱基时停止复制。G5U 删除了尿嘧啶结合域, 使其能够读取和扩增含有尿嘧啶的模板, 该性能赋予其独特的“U”特征。其有两个重要的应用方向: (1) 用于超保真扩增重亚硫酸氢盐转化、脱氨基、或受损 DNA; (2) 在超保真扩增中搭配 dUTP 和热敏 UDG, 用于防止 PCR 体系中携带污染。除此外, 也多用于 USER 克隆。

组分

名 称	200 U	1000U
G5U HiFi Polymerase(2U/μl)	100 μl	500 μl
10×G5U Buffer(with Mg ²⁺)	1.25 ml	1.25 ml×5

(1) 活性定义: 一个活力单位指 74°C 条件下, 30min 催化 10 nmol dNTP 的掺入反应, 成为酸不溶性物质所需的酶量。

(2) PCR 反应性能: 以 λDNA 为模板, 扩增 20kb DNA 片段; 以人类基因组 DNA 为模板, 扩增 8kb DNA 片段。

(3) 酶存储液: 10 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 50%Glycerol。1xG5U Buffer 中含 1.5 mM Mg²⁺, 必要时可自行调整补充。

(4) 储存: -20°C 可保存 3 年。

使用方法

1. 按以下组分配制 PCR 反应液

	1x 下浓度	
10×G5U Buffer(with Mg ²⁺)	5 μl	1x
G5U HiFi Polymerase(2U/μl)	0.5 μl	20 mU/μl
dNTP Mixture(10 mM each)	1 μl	200 μM
上游引物(10μM)	1 μl	200 nM
下游引物(10μM)	1 μl	200 nM
模板 DNA	x μl	
ddH ₂ O upto	50 μl	

2. 推荐的“万能 PCR 扩增参数”

		<0.5kb	<1kb	1-2kb	2-3kb	>3kb
预变性	95°C	1min	1min	1min	1min	1min
循环 1	95°C	10s	10s	10s	10s	10s
5 cycles	65°C	15s	30s	45s	90s	2kb/min
循环 2	95°C	10s	10s	10s	10s	10s
23 cycles	55°C	10s	10s	10s	10s	10s
	72°C	15s	30s	45s	90s	2kb/min
末延伸	72°C	1min	1min	1min	1min	1min

特殊说明: (1) 该“万能 PCR 扩增参数”在实际应用中, 引物 TM 值 (50-70°C) 范围内均获得良好的扩增。该程序扩增总循环数为 28 (5+23), 如产物扩增亮度不足, 则增加循环 2 的次数到 25-28 个, 通常不宜超过 28。(2) 如果仍然不能获得良好的扩增结果, 则可以改变, 循环 2 中的退火温度为 50-65°C (上表中为 55°C)。

使用注意事项 (必读)

(1) 引物、模板、酶浓度使用参考表

在 1x 反应体系下	引物浓度 (nM)	酶浓度 (mU/μl)	模板浓度 (ng/μl)
<4kb	200	20	基因组 (0.01-1) 简单模板 (0.01-0.1)
>4kb	100	20-30	基因组 (0.05-4) 简单模板 (0.01-0.1)

(2) 在进行防污染扩增时, dNTP 中的 dTTP 可用 dUTP 来代替, dUTP 占比 75-100%。该酶可以用 dUTP 完全取代 dTTP, 扩增效率有所下降, 但通常不影响下游应用(建议扩增片段<1kb)。在防污染扩增时, 通常需要搭配热敏 UDG (货号: C5029) 来实现污染物的去除, 热敏 UDG 的使用浓度通常为 (0.01-0.05U/μL)。

(3) 扩增片段 GC 含量>65%时, 推荐添加 5xQ Solution (货号: A3002) 至 1x 浓度, 来提升高 GC 含量的扩增性能。