

**描述:** G5U Plus High-Fidelity DNA Polymerase, 融合 Q5 和 Q5U 的性能于一身, 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 4kb/min 以上的延伸速度。该酶具有 5'-3' 的聚合酶活性、强 3'-5' 的外切酶活性, 产物为平末端。G5U Plus 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。

HotStart G5U Plus 是具有热启动功能的版本, 由独特适配体封闭酶活性中心, 在反应结束恢复室温后, 适配体可逆的重新封闭聚合酶。其热启动功能确保, 在 25°C 以下无活性 (酶活泄漏 <10%), 高于 50°C 后迅速恢复 100% 活性。热启动功能便于室温建立反应体系、有效的降低低温下的非特异扩增、提高多重超保真扩增效果, 使超保真扩增达到最佳。

#### 组分

名称	100 U	1000U
HotStart G5U Plus Polymerase(2U/μl)	50 μl	500 μl
5xG5U Buffer1	1.25 ml	15 ml
5xG5U Buffer2	1.25 ml	1.25 ml

**储存:** -20°C 可保存 3 年。

**特殊说明:** (1) G5U Buffer1, 用于 4kb 以下的片段扩增, 及多重扩增, Buffer1 总能获得更特异的单一条带; (2) G5U Buffer2 是高产 PCR 和复杂模板扩增的专用 Buffer, 用于 4kb 以上片段扩增, 在扩增良好的引物条件下, Buffer2 总能获得更高的产量。

#### 使用方法

##### 1. 按以下组分配制 PCR 反应液

	1x 下浓度	
5xG5U Buffer1 or 2	4 μl	1x
HotStart G5U Plus (2U/μl)	0.2 μl	20mU/μl
dNTP Mixture (10 mM each)	0.4 μl	200 μM
上游引物 (10 μM)	0.4 μl	200 nM
下游引物 (10 μM)	0.4 μl	200 nM
模板 DNA	X μl	
ddH <sub>2</sub> O	Up to 20 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 Cycle	65°C	15s	30s	45s	90s	2kb/min
循环 2	95°C	10s	10s	10s	10s	10s
23 Cycle	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 T<sub>m</sub> 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	20-40	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 GC 含量的扩增性能。

(4) 1xBuffer1 和 2, 含有 1.5mM Mg<sup>2+</sup>, 必要情况下可调整用量。