

T4 UvsX Recombinase

Cat.No.:A4601 Store at: -20°C



描述:UvsX 重组酶, 来源于 T4 噬菌体, 是 RecA/Rad51 家族的同源体。RecA/Rad51 重组酶家族在双链 DNA 断裂的无误修复和复制重新启动的过程中起到重要作用。T4 UvsX 重组酶可与其他重组酶一起锚定在单链 DNA 上并激活其在其他双链 DNA 上寻找同源序列, 以进一步完成链置换。经检测, 该酶无核酸酶活性。

组分

名称	300 µg	3 mg
T4 UvsX Recombinase (3 µg/µl)	100 µl	1 ml
2xRPA BufferMix	0.5 ml	1 mlx5
280mM Mg(OAC) ₂	0.1 ml	1 ml

储存: 置于 -20°C 可保存 1 年, -80°C 长期保存, 短期使用置于 4°C, 保存一个月, 避免反复冻融。

热失活: 60°C, 10min。

酶储存液: 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10% Trehalose, pH 7.5。

2xRPA BufferMix: 包含反应缓冲盐、ATP、磷酸肌酸、dNTP、PEG、DTT、BSA 等, 可用于 RPA 扩增试验。该试剂 4°C 条件下放置 1 个月性能无下降。

HaiGene 基于本蛋白进行 RPA 反应测试的全套试剂

名称	厂家	货号
T4 UvsX Recombinase (3 µg/µl)	HaiGene	A4601
T4 UvsY Protein (1.5 µg/µl)	HaiGene	A4701
T4 gene 32 protein(5 µg/µl)	HaiGene	C5003
Bsu DNA Polymerase(10U/µl)	HaiGene	A4801
Sau DNA Polymerase(10U/µl)	HaiGene	A4901
Bst 4.0 Polymerase(32U/µl)	HaiGene	A3805L
肌酸激酶 (CK) (10 µg /µl)	Sigma	1012756 6001
Exonuclease III(100U/µl)	HaiGene	C5026
2xRPA BufferMix	HaiGene	X 附带
280mM Mg(OAC) ₂	HaiGene	X 附带

HaiGene 用于 RPA 扩增的测试引物与探针

CPV-F (20uM) CACTTACTAAGAACAGGTGATGAATTTGCTACAG
CPV-R (20uM) AGTTTGTATTTCCCATTTGAGTTACACCACGTCT
Probe (10uM) CCTCAAGCTGAAGGAGGTACTAACTTTGGT[dT-BHQ1]
[THF][dT-FAM]ATAGGAGTTCAACAAG -(C3)
Canine parvovirus type 2,VP2 (Genebank No.: M24003.1)

使用实例

1. 进行 Basic RPA 扩增 (25µl 体系)

		终浓度
T4 UvsX Recombinase (3 µg/µl)	3 µl	360ng/µl
T4 UvsY Protein (1.5 µg/µl)	0.4 µl	24ng/µl
T4 gene 32 protein(5 µg/µl)	1.5 µl	300ng/µl
Primer F (20 µM)	0.5 µl	400 nM
Primer R (20 µM)	0.5 µl	400 nM
2xRPA BufferMix	12.5µl	1x
肌酸激酶 (CK) (10 µg /µl)	0.25 µl	100ng/µl
DNA Polymerase	5-10 U	0.2-0.4 U/µl
ddH ₂ O	X	
总体积	22.75 µl	

加入 1µl 的模板 DNA, 上机反应前加入 1.25 µl 的 280 mM Mg(OAC)₂ (终浓度 14 mM), 总反应体积 25 µl。混合均匀, 并离心, 置于 39-42°C 条件下反应 30min。

2. 进行荧光 RPA 扩增

在进行荧光检测时体系中, 额外加入 0.3 µl 的 10µM Probe (120 nM 的终浓度) 和 50U 的 Exonuclease III (2U/µl 的终浓度), 即可进行荧光检测。本方法应用原理为 ExoIII 切割 THF 位点, 使荧光与猝灭基团分离, 报告荧光信号。

特别说明:

(1) HaiGene 以上 RPA 扩增测试属于蛋白功能性测试, 按照以上实验操作流程, 可获得 RPA 扩增产物。进一步的优化, 包括: X、Y、GP32、聚合酶、反应 Buffer, 甚至加样顺序, 均可能进一步提高 RPA 的扩增性能。

(2) 关于 DNA 聚合酶的选择, HaiGene 测试了三种常见的 DNA 聚合酶, 在进行荧光法测定时, 推荐的选择顺序依次为 Bst 4.0> Bsu> Sau, 且在 42°C 条件下, 总能获得最快的扩增速度, 且荧光信号更强。在 Basic 扩增中 Sau 表现出特异性扩增能力更佳。

(3) 关于 RPA 的灵敏度与非特异扩增, 在 Basic 试剂的扩增中, 仍然存在非特异扩增产物, 这需要进一步优化反应组分及引物序列。在使用荧光探针法时, 但由于特异性探针的存在, 非特异扩增产物通常无荧光信号值, 但此时会影响检测灵敏度。GP32 蛋白的浓度增加会显著降低非特异性扩增, 但会导致扩增速度减缓, 此时需要同步增加 X 与 Y 蛋白的用量, 以维持 RPA 的扩增速度。

(4) 据文献报道, 在进行试纸条 RPA 实验时, 倾向使用 Nfo 内切酶 (又名 Endonuclease IV, HaiGene 货号 C5027) 来对扩增探针进行切割, 但 HaiGene 未予测试, 目前无法提供相应参数。

(5) RPA 反应 Buffer 对扩增至关重要, 轻微的浓度差异, 均可导致扩增效率大幅下降, 甚至失败。RPA BufferMix 为粘稠试剂, 使用时务必保证加样准确, Tip 头中的残液务必完全打入 EP 管中。