

超热稳定单链结合蛋白(ET SSB)

产品编号	产品名称	包装
D7026S	超热稳定单链结合蛋白(ET SSB)	50 μ g
D7026M	超热稳定单链结合蛋白(ET SSB)	200 μ g

产品简介:

- 碧云天生产的超热稳定单链DNA结合蛋白(ET SSB), 即Extreme Thermostable Single-Stranded DNA Binding Protein, 是由碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种在95°C孵育60分钟后仍保持完全活性的具有极高热稳定性的单链DNA结合蛋白。ET SSB能以聚合体的形式与单链DNA结合, 保护单链DNA免受核酸酶降解或防止单链DNA重新配对形成二级结构, 常用于核酸扩增及测序[1]。
- ET SSB蛋白是一种不依赖于特异性序列的单链DNA结合蛋白, 它不能结合RNA或双链DNA。ssDNA存在易被DNase降解、易形成二级结构等特点, 其不稳定性极大限制了酶促反应的正常进行; ET SSB蛋白与ssDNA的结合可稳定并保护单链DNA免受DNase降解或形成二级结构, 促使DNA聚合酶与底物结合, 进而提高DNA聚合酶的催化活性, 改善PCR等的扩增效率。
- SSB蛋白存在于几乎所有种类的生物中, 虽然所有的SSB蛋白都具有相似的功能, 但它们的序列相似性很小、与ssDNA结合特性差异较大, 根据其聚集状态, SSB蛋白可分为单体、同源二聚体、异源三聚体和同源四聚体四类。ET SSB蛋白源自极度嗜热微生物, 在溶液中主要以单体形式存在, 每个单体编码一个OB-fold结构域, 只有在结合单链DNA底物时, 才会形成二聚体或多聚体[3]。
- ET SSB蛋白与*E.coli* SSB蛋白具有相似的单链DNA结合特性, 但因存在单个与DNA结合的OB-fold结构域及一个灵活的C端尾部结构, 具有更强的热稳定性[4], 在95°C孵育60分钟后仍保持完全活性; 而*E.coli* SSB蛋白则在高于65°C时就失去大部分活性。
- 碧云天的ET SSB蛋白与*E.coli* SSB蛋白热稳定性比较请参考图1。

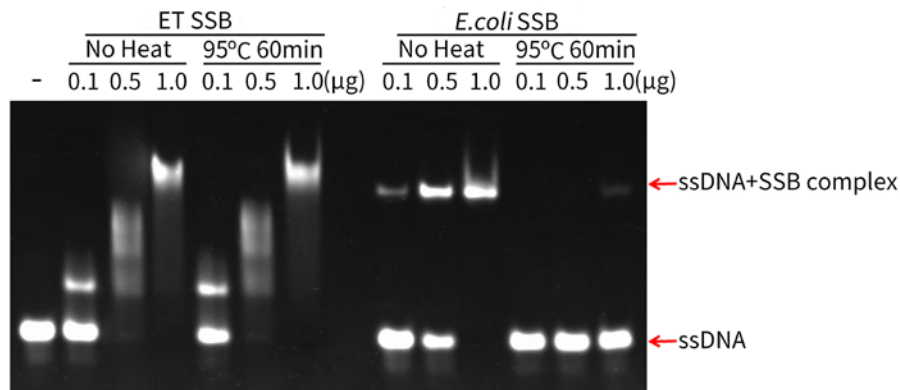


图1. 碧云天超热稳定单链结合蛋白(ET SSB) (D7026)与*E.coli* Single-Stranded DNA Binding Protein (SSB) (D7024) (*E.coli* SSB)的热稳定性对比图。在10 μ l反应体系中, 加入10pmol ssDNA (56bp)及图中指定量的本产品或*E.coli* SSB蛋白(0-1 μ g), 随后用缓冲液(10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, pH7.5 @ 25°C)补齐至10 μ l, 37°C孵育15分钟, 使充分结合。取10 μ l反应产物, 加入1 μ l EMSA/Gel-Shift上样缓冲液(蓝色, 10X) (GS007)混匀, 使用BeyoGel™ EMSA PAGE预制胶(6%, 15孔) (GS306)在100V条件下进行电泳检测。电泳结束后, 在室温下使用NA-Red (EB升级换代产品, 2000X) (D0128/D0130)对凝胶进行染色20-30分钟, 紫外灯下拍照观察实验结果。如图所示, 与*E.coli* SSB蛋白相比, ssDNA与ET SSB蛋白所生成的复合物并不会因热处理被破坏, 说明本产品与ssDNA结合具有良好的热稳定性。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。

- **用途:** 提高PCR和RT-PCR反应DNA聚合酶扩增效率; 稳定单链DNA结构; 促进RecA蛋白对单链DNA的结合活性和链置换能力。
- 碧云天ET SSB蛋白优化多重PCR反应的效果请参考图2。

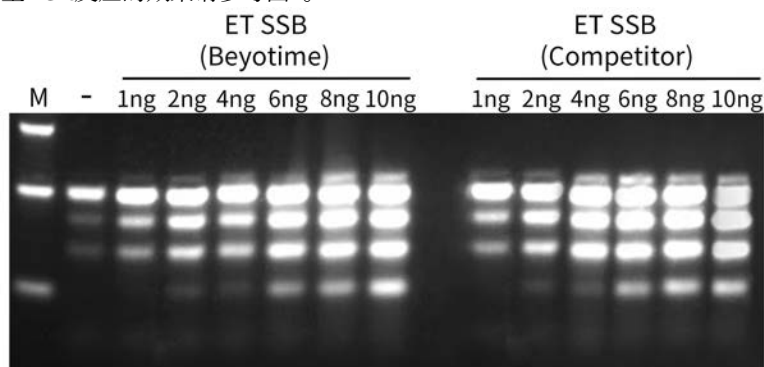


图2. 碧云天超热稳定单链结合蛋白(ET SSB) (D7026)和国外N公司(Competitor)的同类产品优化多重PCR反应的活性检测效果图。在10 μ l反应体系中,加入1 μ l 10X BeyoFusion™ Buffer (with Mg²⁺)、0.5U BeyoFusion™ DNA Polymerase (D7221)、0.8 μ l dNTP Mixture (2.5mM each) (D7371)、0.1 μ l五对引物混合物(10 μ M each)、0.1ng模板、图中指定量的ET SSB (1-10ng),随后用超纯水补齐至10 μ l。设置PCR反应程序:92°C预变性3分钟,92°C变性30秒,55°C退火30秒,68°C延伸30秒,共35个循环,68°C最终延伸10分钟。反应结束后,加入2 μ l DNA上样缓冲液(6X) (D0071)混匀,使用1%琼脂糖凝胶进行电泳检测。电泳结束后,紫外灯下拍照观察实验结果。如图所示,本产品与N公司产品相比,对DNA聚合酶的扩增反应有相似的促进作用。实际检测效果会因实验条件、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。

- **来源:** 通过 *E.coli* 重组、表达纯化而获得,表达基因来源于嗜热微生物。
- **分子量:** 16kDa。
- **纯度:** 经SDS-PAGE检测,纯度大于95%;且不含DNase、RNase和磷酸酯酶。
- **储存液:** 10mM Tris-HCl, 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 50% (v/v) Glycerol (pH7.4 @ 25°C)。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7026S	超热稳定单链结合蛋白(ET SSB) (0.5 μ g/ μ l)	100 μ l
D7026M	超热稳定单链结合蛋白(ET SSB) (0.5 μ g/ μ l)	400 μ l
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存,两年有效。

注意事项:

- 首次开管盖前,建议8,000-12,000 \times g离心约10秒,使附着在管盖或管壁上的液体聚集于管底。
- ET SSB蛋白在大多数DNA聚合酶的PCR缓冲液中都具有活性,参考工作浓度为4ng/ μ l。
- 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. ET SSB蛋白可广泛兼容各种PCR、DNA测序、限制性内切酶酶切等常见的分子生物学反应体系,为保护ssDNA不被DNase降解,推荐在反应体系中加入终浓度为4ng/ μ l的ET SSB。具体的一些用途可以参考如下的使用说明。
2. 单链DNA结合实验。
 - a. 在10 μ l反应体系(10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, pH7.5 @ 25°C)中加入适量的ssDNA及2 μ l (1 μ g)的ET SSB蛋白。
 - 注1: 建议最后添加ET SSB蛋白。
 - 注2: 请在冰浴上配制反应体系。
 - 注3: ssDNA的用量可按照ET SSB蛋白与ssDNA的摩尔比为4:1左右进行调整和尝试。
 - 注4: 最佳ssDNA添加量的参考标准是:在固定ET SSB蛋白使用量不变的情况下,加入ssDNA进行结合反应后所形成的ET SSB蛋白与ssDNA复合物的量最多,且不会出现过量的游离ssDNA时即为最佳使用量。
 - 注5: ET SSB蛋白通常能兼容各种类型的反应缓冲液,可广泛适用于大多数常规分子生物学反应体系。
 - b. 配制好反应体系后,适当轻轻混匀反应体系,随后低速离心以使粘附在管壁上的液体沉淀至管底。
 - c. 反应条件: 37°C孵育15分钟(注意保持恒温,否则会影响ssDNA与ET SSB蛋白的结合效率)。
 - 注: 反应时间可以根据实际情况酌情适当调节。
 - d. 取适量反应后产物,按比例加入EMSA上样缓冲液,混合均匀。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)。
 - e. 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(GS301/GS302/GS305/GS306)或EMSA PAGE凝胶配制试剂盒(GS298)。
 - 注: 在正式电泳前,推荐在100V条件下,预电泳30分钟,随后上样并在冰上使用100V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。
 - f. 使用碧云天的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ET SSB蛋白与ssDNA的结合效果。
3. 多重PCR扩增实验。
 - a. ET SSB蛋白在DNA复制或修复过程中,能阻止解旋酶释放的单链DNA返回到双链DNA,增加DNA聚合酶的活性,最终促进DNA复制或修复。如需使用ET SSB蛋白改善多重PCR的扩增效果,可参考如下步骤进行。
 - b. 引物设计。
 - 引物设计对于成功进行多重PCR至关重要,建议使用适当的引物设计软件进行引物设计:
 - (1) 引物的长度通常为20-30个核苷酸;
 - (2) GC含量为40-60% (优选45-55%);
 - (3) 避免所用的多个引物的3'末端出现互补序列,避免引物3'末端有3个或更多的G/C,避免引物内的二级结构;

(4) 在尽可能的情况下所用引物的T_m值不低于60°C, 推荐在T_m值在65-68°C之间更佳, 引物间的T_m值差异应控制在5-6°C以内。此处提到T_m值按照T_m=2n(A)+2n(T)+4n(G)+4n(C)进行计算, 例如一条引物含有3个A、7个T、4个G和6个C, 那么T_m=2×3+2×7+4×4+4×6=60。

c. 引物配制。

每种合成的引物推荐配制为100μM, 然后配制成每个引物的最终浓度为10μM的引物混合物。

d. 按照下表配制反应体系。

Reagent	Volume
Ultrapure Water	xμl
10X BeyoFusion™ Buffer (with Mg ²⁺)	1μl
dNTP (2.5mM each)	0.8μl
Template	yμl (0.1ng)
Primer mix (10μM each)	0.1μl
ET SSB (50ng/μl)	0.8μl (40ng)
BeyoFusion™ DNA Polymerase	0.2μl
Total Reaction Volume	10μl

注1: ET SSB (50ng/μl)可以使用自行配制的储存液: 10mM Tris-HCl, 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 50% (v/v) Glycerol (pH7.4 @ 25°C)、1X BeyoFusion™ Buffer (with Mg²⁺)或其它适当溶液把超热稳定单链结合蛋白(ET SSB) (0.5μg/μl)稀释10倍获得。

注2: Template及其所对应的Primer mix (10μM each)的使用量仅供参考, Template或Primer mix (10μM each)不同, ET SSB蛋白对PCR反应的促进效果也不同, 可设置Template或Primer mix (10μM each)浓度梯度以确认最佳使用量。

e. 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。

f. 按照下表设置PCR反应程序。

PCR Process Steps	Cycles	Temperature	Time	Description
Step 1	-	92°C	3min	Initial denaturation
Step 2	35	92°C	30s	Denaturation
		55°C	30s	Annealing
		68°C	15s/kb	Extension
Step 3	-	68°C	10min	Final extension
Step 4	-	4°C	Forever	Hold

g. 向反应体系中加入2μl DNA上样缓冲液(6X) (D0071), 然后使用1%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

4. 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. Shereda RD, Kozlov AG, Lohman TM, Cox MM, Keck JL. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2008. 43(5):289-318.
2. Olszewski M, Grot A, Wojciechowski M, Nowak M, Mickiewicz M, et al. BMC Microbiol. 2010. 10:260.
3. Morten MJ, Peregrina JR, Figueira-Gonzalez M, et al. Nucleic Acids Res. 2015. 43(22):10907-24.
4. Morten MJ, Gamsjaeger R, Cubeddu L, Kariawasam R, Peregrina J, et al. Extremophiles. 2017. 21(2):369-379.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7024	<i>E.coli</i> Single-Stranded DNA Binding Protein (SSB)	100μg/500μg/2mg
D7025	Recombinant <i>E.coli</i> RecA Protein	200μg/1mg
D7026	超热稳定单链结合蛋白(ET SSB)	50μg/200μg
P7415	Recombinant SSB	100μg/500μg
D7050	<i>Bst</i> DNA Polymerase, Large Fragment	800U/4000U
D7053	phi29 DNA Polymerase	250U/1kU/5kU/20kU
D7055	<i>Bsu</i> DNA Polymerase, Large Fragment	200U/1000U
D7057	T4 Gene 32 Protein (ssDNA结合蛋白)	100μg/500μg/2mg
D7220/D7221	BeyoFusion™ DNA Polymerase	200U/1000U
D7301	BeyoMulti™ 多重PCR试剂盒	100次/500次
D7303S	BeyoMulti™ PCR Enhancer (2X)	2ml
D7305	Easy-Load™ Multiplex PCR Master Mix (2X)	100次/500次
D7360	Uracil-DNA Glycosylase (<i>E.coli</i>)	1000U/5000U
D7362	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Bacterium)	100U/500U

D7364	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Cod)	200U/1000U/5000U
D7371	dNTP Mixture (2.5mM each)	1ml
D7373	dNTP Mixture (25mM each)	250 μ l

Version 2025.02.07