

Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase

产品编号	产品名称	包装
D7239S	Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase	100U
D7239M	Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase	500U
D7239L	Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase	2000U

产品简介:

- 碧云天生产的Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase, 即Q6U™高保真DNA聚合酶, 是碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的重组酶。它是一种以嗜热古细菌DNA聚合酶为基础通过突变等改造其“尿嘧啶结合口袋”而获得的能识别和扩增含有尿嘧啶(uracil)和次黄嘌呤(hypoxanthine)的模板DNA的超高性能DNA聚合酶, 因此它除了具有扩增速度快、保真度极高、扩增片段可以轻松达到12kb等优点之外, 还可以利用dUTP (2'-deoxy-uridine 5'-triphosphate)和dITP (2'-deoxy-inosine-5'-triphosphate)进行基因扩增, 其扩增效果请参考图1和图2。
- 碧云天的Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase和NEB公司的Q5U™ HotStart High-Fidelity DNA Polymerase、Thermo公司的Phusion U Hot Start DNA Polymerase、Roche公司的KAPA HiFi HotStart Uracil+ Ready Mix (2X)有非常类似的扩增效果和用途。
- Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase用于二代测序建库相关扩增时, 具有扩增效率极高, 低GC偏好性(low GC bias)等优良特性, 特别适用于亚硫酸处理的(bisulfite-converted)、脱氨基的(deaminated)或甲醛固定石蜡包埋(formalin fixation and paraffin embedding, FFPE)等导致的损伤的(damaged) DNA样品的扩增, 以及PCR扩增时可以掺入dUTP并和尿嘧啶-N-糖基化酶(uracil-N-glycosylase, UNG)处理相结合可以有效避免PCR扩增产物污染导致的假阳性。DNA长期保存会出现随机的Cytocine脱氨基现象, 导致普通的DNA聚合酶无法扩增, 而本产品可以兼容并扩增脱氨基的DNA^[1-3]。
- Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase是一种高保真DNA聚合酶, 它不仅非常高效地催化5'至3'方向的依赖于DNA模板的聚合酶活性, 同时还具有3'至5'的外切酶活性(proofreading activity), 它的错误发生概率比Taq酶低40-50倍, 其扩增产物为平端(blunt end), 因此不能直接进行T载体克隆连接。如需用于T载体克隆, 需在其扩增结束后加入常规量的普通Taq酶在72℃反应5-10分钟, 使每条链的3'端加上一个A以形成粘端。

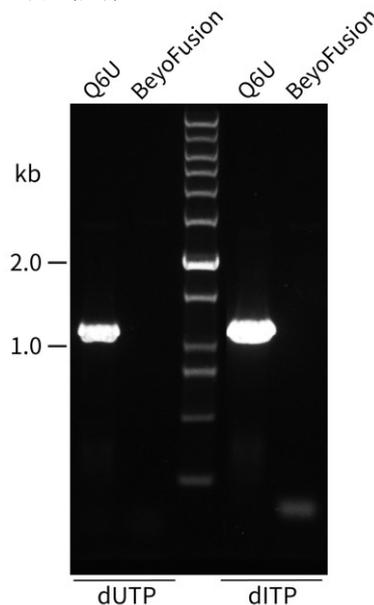


图1. 碧云天生产的Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase (简称Q6U™)和BeyoFusion™ DNA Polymerase (简称BeyoFusion)使用dUTP或dITP为底物扩增约1.2kbDNA片段的效果对比图。dUTP组的反应体系为50μl: 5μl 10X Q6U™ Buffer或10X BeyoFusion™ Buffer, 2μl Primers (10μM each), 5μl dNTP/dUTP Mixture (2.5mM each/5mM) (D7376), 1μl模板质粒(20ng/μl), 36μl Nuclease-free Water, 冰上混合后加入1μl Q6U™或BeyoFusion™。dITP组的反应体系为50μl: 5μl 10X Q6U™ Buffer或10X BeyoFusion™ Buffer, 2μl Primers (10μM each), 5μl dNTP/dITP Mixture (2.5mM each + 0.25mM dITP), 1μl模板质粒(20ng/μl), 36μl Nuclease-free Water, 冰上混合后加入1μl Q6U™或BeyoFusion™。按照说明书推荐的PCR程序反应完毕后, 加入10μl DNA上样缓冲液(6X) (D0071), 取5μl使用1%琼脂糖凝胶电泳检测其扩增效果。参考上图, Q6U™ DNA Polymerase可以高效利用dUTP和dITP为底物扩增目的片段, 而BeyoFusion™ DNA Polymerase则完全不能。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

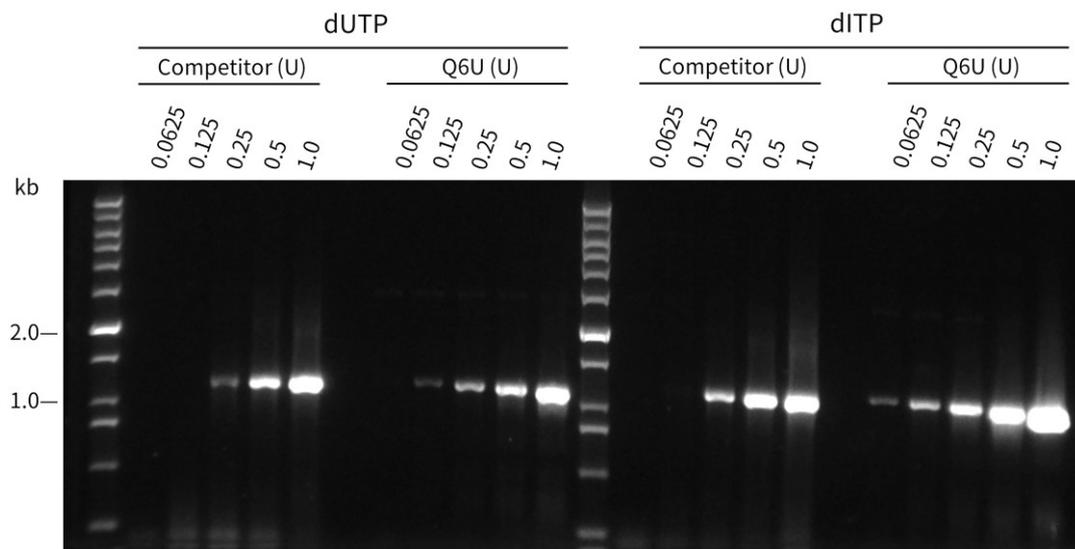


图2. 碧云天Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase (简称Q6U)与N公司生产的同类产品(Competitor)利用dUTP和dITP扩增目的片段(约1.2kb)的效果对比图。Q6U使用图1中的反应体系, N公司产品使用其产品说明书推荐的反应体系, 酶的用量为图中标示的用量, U为活力单位。参考上图, 碧云天Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase能很好地使用dUTP和dITP进行扩增, 并且其扩增效果略优于国外N公司的同类产品。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **来源:** Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase通过大肠杆菌重组、表达、纯化而获得。
- **用途:** 常规的DNA高效高保真扩增, 特别适用于扩增亚硫酸处理的(bisulfite-converted)DNA样品用于DNA甲基化测序, 特别适用于扩增脱氨基的(deaminated)或甲醛固定石蜡包埋(formalin fixation and paraffin embedding, FFPE)等导致的损伤的(damaged) DNA样品的扩增, 以及PCR扩增时可以掺入dUTP并和尿嘧啶-N-糖基化酶(uracil-N-glycosylase, UNG)处理相结合可以有效避免PCR扩增产物污染导致的假阳性。
- **活性定义:** One unit is defined as the amount of enzyme that will incorporate 10nmol of dNTP into acid insoluble material in 30 minutes at 74°C。
- **纯度:** 不含DNA内切酶和磷酸酯酶, 不含RNA酶。
- **酶储存溶液:** 40mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 100mM KCl, 300μg/ml BSA and 50% (v/v) glycerol。
- **失活或抑制:** 酚氯仿抽提可以使Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase失活。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7239S-1	Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase (2U/μl)	50μl
D7239S-2	10X Q6U™ Buffer	500μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7239M-1	Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase (2U/μl)	250μl
D7239M-2	10X Q6U™ Buffer	2.5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7239L-1	Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase (2U/μl)	1ml
D7239L-2	10X Q6U™ Buffer	10ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 至少2年有效。

注意事项:

- PCR反应非常灵敏, 在进行扩增反应时请注意避免微量待扩增DNA的污染, 并尽量考虑设置不加模板的空白对照。
- 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. PCR反应体系的设置:

- 溶解并混匀PCR反应所需的各种溶液。将Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在冰浴上设置PCR反应(如果有多个类似的PCR反应,可以根据反应数量先配制底物和引物之外的混合物,然后分装到各PCR反应管内。根据情况,有时混合物中可以包括底物或引物):

Reagent	To amplify dsDNA < 6kb		To amplify dsDNA > 6kb	
	Final concentration	Volume	Final concentration	Volume
Nuclease-free water	-	(38.5-x)µl	-	(32.5-y)µl
10X Q6U™ Buffer	1X	5µl	1X	5µl
dNTP (2.5mM each)	0.25mM each	5µl	0.5mM each	10µl
Template DNA	10pg-1µg*	xµl	10pg-1µg*	yµl
Primer mix (10µM each)	0.2µM each	1µl	0.4µM each	2µl
Q6U™ High-Fidelity DNA	1U/50µl	0.5µl	1U/50µl	0.5µl
Total volume	-	50µl	-	50µl

*不同类型的DNA模板的推荐用量有所不同。哺乳动物基因组DNA: 100ng; 大肠杆菌基因组DNA: 100ng; 质粒DNA: 5-30ng。扩增大于6kb的片段时,模板量宜适当加大,但过多的模板DNA也容易导致非特异性的PCR扩增产物。在推荐用量时相对会非常容易扩增出目的片段,实际应用时如果模板DNA的量比较少,完全可以大大少于推荐的用量的。

注:参考上表,在扩增大于6kb的片段时dNTP和引物的用量和扩增小于6kb片段时相比需要加倍。

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀,室温离心数秒,使液体积聚于管底。
 - 如果所使用的PCR仪有热盖则省略本步骤。如果PCR仪没有热盖,则在管内滴入一滴矿物油(ST275)。
 - 设置好的PCR反应管置于PCR仪上,开始PCR反应。
2. PCR反应参数的设置可以参考如下表格:

Step	To amplify dsDNA	To amplify dsDNA	Description
STEP1	94°C 3min	94°C 3min	Initial denaturation
STEP2	94°C 30sec	94°C 30sec	Denaturation
STEP3	55°C 30sec	55°C 30sec	Annealing
STEP4	68°C 15s/kb	68°C 1min/kb	Extension
STEP5	Go To STEP2 for 30	Go To STEP2 for 30	PCR cycles
STEP6	68°C 10min	68°C 15min	Final extension
STEP7	4°C forever	4°C forever	Hold

- 起始变性和变性的温度设置为94°C,延伸温度设置为72°C,其余条件不变时,都可以进行正常的PCR扩增,但扩增效果会稍有下降。对于较难扩增的序列,推荐使用92°C变性和72°C延长。
- PCR反应的设置需根据模板、引物、PCR产物的长度和GC含量等条件的不同设定不同的温度、时间和循环数等。
- STEP4 (Extension)的时间设置需根据PCR产物的长度进行设置,对于本产品扩增小于6kb的DNA片段时,推荐每kb产物的延伸时间为15秒。例如PCR产物的长度为1kb,则延伸时间可以设置为15秒,PCR产物的长度为2kb,则延伸时间可以设置为30秒,以此类推。扩增大于6kb的DNA片段时,推荐每kb产物的延伸时间为1分钟。例如PCR产物的长度为10kb,则延伸时间可以设置为10分钟,PCR产物的长度为12kb,则延伸时间可以设置为12分钟,以此类推。
- 对于初次进行的PCR,为尽量确保可以扩增出预期的PCR产物,可以把循环数设置为35。对于需进行半定量或定量的PCR反应,循环数一定要进行适当优化,使PCR反应没有达到平台期。

常见问题:

1. PCR产物非常少或没有特异性条带。

- 引物设计不佳是PCR过程中最常见的问题。请选择适当的引物设计软件进行引物设计,注意引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在加入酶切位点等的引物中,一定要注意加入酶切位点等后整条引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在原有引物效果不佳的情况并且阳性对照引物可以正常工作的前提下,可以考虑更换引物。
- 待扩增片段GC含量偏高。GC含量较高的情况下PCR会变得相对比较困难,此时可以使用适合扩增高GC含量DNA片段的GC-rich buffer,并相应地根据GC-rich buffer的要求或说明调整PCR反应参数的设置。直接添加1-10% DMSO或5-20%甘油对于扩增高GC含量的片段也有帮助。
- PCR反应设置时在室温进行容易导致非特异性条件。推荐在冰浴上设置PCR反应。
- 由于引物存在一定的二级结构或存在一定的引物二聚体,或引物偏短,导致退火效果不佳。此时可以采用Touch down等方法进行退火,通常采用从65°C逐步缓慢降温到55°C或50°C的方法,使退火更加充分。
- 退火温度不佳,需要优化。如果有温度梯度PCR仪,则可以设置退火的温度梯度,摸索退火的最佳温度。如果没有温度梯度PCR仪,则可以通过多次PCR反应摸索最佳的退火温度。
- 延伸时间不足。可以在推荐的延伸时间基础上把延伸时间延长2-5倍,对于较难扩增的片段可以设置为每1kb延伸5分钟。
- 待扩增片段GC含量较高或长度较长,变性不够充分。可以调节起始变性条件至95°C 1min甚至95°C 2-4min。
- 在不同PCR仪上进行PCR反应,避免有时PCR仪出现问题。
- 循环数不足,适当延长PCR的循环数。通常循环数最高不必超过40,常用的循环数范围为25-35。

- j. 模板含量太低, 适当加大模板量, 或采用巢式PCR (nested PCR)或二次PCR。巢式PCR即为在原先设计的PCR引物内侧再设计一对PCR引物, 然后对第一次PCR产物进行稀释后再进行一次PCR扩增, 这样一方面可以起到扩增作用, 同时也可以从第一次PCR产物中扩增出特异性条带。二次PCR则为比较简单地用原有引物对第一次PCR产物进行稀释后再进行一次PCR扩增, 可以起到扩增作用, 但不能去除非特异性条带。
 - k. 模板中含有抑制PCR反应的物质, 可以用适当的DNA纯化方法例如柱纯化等纯化模板DNA。
 - l. 对PCR引物进行脱盐纯化。
 - m. 使用高质量的dNTP混合物。
 - n. 适当增加DNA polymerase的用量。
 - o. 当产生较多非特异性条带时, 可以适当提高退火温度。
 - p. 注意设置适当的阳性对照和阴性对照通常会有很大帮助。
2. 杂带较多或条带弥散。
- a. 退火温度提高2-5°C。
 - b. 减少DNA模板的用量。
 - c. PCR反应设置时在室温进行容易产生非特异性条带。推荐在冰浴上设置PCR反应。
 - d. 适当减少Q6U™ High-Fidelity DNA Polymerase用量。
 - e. 适当缩短延伸时间。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7376-1ml	dNTP/dUTP Mixture (2.5mM each/5mM)	1ml
D7376-5ml	dNTP/dUTP Mixture (2.5mM each/5mM)	5ml
D7359-250µl	dUTP (100mM)	250µl
D7359-1ml	dUTP (100mM)	1ml
D7362S	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Bacterium)	100U
D7362M	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Bacterium)	500U
D7360S	Uracil-DNA Glycosylase (E. coli)	1000U
D7360M	Uracil-DNA Glycosylase (E. coli)	5000U
D7364S	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Cod)	200U
D7364M	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Cod)	1000U
D7364L	Uracil-DNA Glycosylase (Heat-labile, Cod)	5000U
D7205	Taq DNA Polymerase	200U
D7207	Taq DNA Polymerase	1000U
D7209	Taq DNA Polymerase	5000U
D7216	Pfu DNA Polymerase	200U
D7217	Pfu DNA Polymerase	1000U
D7218	BeyoTaq DNA Polymerase	200U
D7219	BeyoTaq DNA Polymerase	1000U
D7220	BeyoFusion™ DNA Polymerase	200U
D7221	BeyoFusion™ DNA Polymerase	1000U
D7222	BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase	200U
D7222B	BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase	1000U
D7228	2X PCR Master Mix	400次
D7232	PCR Kit with Taq	400次
D7233	PCR Kit with Taq	2000次
D7237	PCR Kit with BeyoTaq	400次
D7251	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	400次
D7255	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	400次
D7259	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	400次

参考文献:

1. Smith C, Day PJ, Walker MR. Generation of cohesive ends on PCR products by UDG-mediated excision of dU, and application for cloning into restriction digest-linearized vectors. PCR Methods Appl. 1993 May;2(4):328-32.
2. Grogan DW. The question of DNA repair in hyperthermophilic archaea. Trends Microbiol. 2000 Apr;8(4):180-5.
3. Lasken RS, Schuster DM, Rasthchian A. Archaeobacterial DNA polymerases tightly bind uracil-containing DNA. J Biol Chem. 1996 Jul 26;271(30):17692-6.

