



# Xerox DNA Polymerase

## 产品信息:

| 组成                              | AT109 |
|---------------------------------|-------|
| Xerox DNA Polymerase (2.5 U/μl) | 100 U |
| 5× Xerox Buffer                 | 1ml   |
| 5× Green Xerox Buffer           | 1 ml  |
| 5× High GC Enhancer             | 1ml   |
| 25mM MgSO <sub>4</sub>          | 600μl |

**浓度:** 2.5 U/μl

## 产品介绍:

Xerox DNA 聚合酶 (Xerox DNA Polymerase) 是通过 DNA shuffling 技术获得的一种高保真的热稳定 DNA 聚合酶, 用于快速高保真 PCR 扩增。在镁离子存在的条件下, 该酶可催化三磷酸脱氧核苷酸沿 5'→3' 方向发生聚合反应, 合成 DNA。它还具有校正功能的 3'→5' 外切酶活性。Xerox DNA 聚合酶扩增得到的产物为平末端, 可以直接克隆于平末端克隆载体或加 A 尾克隆于普通 T 载体中。Xerox DNA 聚合酶具有更高的保真性 (保真性是 Taq DNA 聚合酶的至少 50 倍, 为 Pfu DNA 聚合酶的 6 倍), 更快的 DNA 合成速度 (15-30sec/kb) 和更强的扩增能力。

**保存条件:** -20℃ 保存, 有效期一年。

**来源:** 重组 Xerox DNA polymerase 基因的大肠杆菌中表达并纯化的酶蛋白。

## 产品用途:

- 高保真 PCR 快速扩增
- 复杂模板的 DNA 扩增
- 长距离 PCR
- 基因定点突变
- 血液直接 PCR 扩增

## PCR 扩增体系:

实际操作中应该首先计算需补加水的体积, 先加水, 然后按下表中所列顺序添加其它成分。充分混匀后, 离心数秒使反应混合物沉到管底, 将反应管置于 PCR 仪中进行扩增。

| Component                      | 25μl<br>Reaction | 50μl<br>Reaction | Final<br>Concentration |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------------|
| Nuclease-Free Water            | Add to 25μl      | Add to 50μl      |                        |
| 5× Xerox Buffer                | 5μl              | 10μl             | 1×                     |
| 10 mM dNTPs                    | 0.5μl            | 1μl              | 200μM                  |
| 10 μM Forward Primer           | 0.5-1μl          | 1-2μl            | 0.2-0.4μM              |
| 10 μM Reverse Primer           | 0.5-1μl          | 1-2μl            | 0.2-0.4μM              |
| Template DNA                   | variable         | variable         | < 1,000ng              |
| 5× High GC Enhancer (optional) | 5 l              | 10μl             | 1×                     |
| Xerox DNA Polymerase           | 0.25-0.5μl       | 0.5-1 μl         | 0.025-0.05U/μl         |

## Note:

5× Xerox Buffer 中含有 10mM 的 MgSO<sub>4</sub>, 通常 PCR 反应的最终 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 2mM 就足够了。如需优化 Mg<sup>2+</sup> 浓度, 可以按 0.5mM 的浓度梯度补加 MgSO<sub>4</sub>。例如, 50μl 反应体系中, Mg<sup>2+</sup> 最终浓度要为 2.5mM, 那么需要额外补加 1μl 体积的 25mM MgSO<sub>4</sub>。

5× High GC Enhancer 用于高 GC 含量的 DNA 模板的 PCR 扩增, 不含 MgSO<sub>4</sub>, 不能够作为 Buffer 单独使用。当 Xerox Buffer 扩增结果不理想时, 可以尝试添加 5× High GC Enhancer 进行扩增, 但是 High GC Enhancer 会导致酶的保真性降低 1-2 倍。

Xerox DNA polymerase 的用量需要注意，扩增 4kb 以上的长片段 DNA 时，酶量过高不利于 PCR 反应，不要超过 0.05 U/ $\mu$ l。

#### 扩增模板：

1. 低复杂基因组模板（质粒、病毒、 $\lambda$ DNA 和 BAC DNA 等），50 $\mu$ l 体系中添加 5-10ng。为了获得更高保真性的扩增产物，高浓度模板和少量 PCR 循环数组合是一个较好的方法。
2. 高复杂基因组模板，50 $\mu$ l 反应体系中，DNA 模板的使用量应该在 100-500ng，如果扩增的片段较长，最好用琼脂糖电泳检测 DNA 的完整性。DNA 的完整性越好，长距离 PCR 的成功率越高。
3. cDNA 模板的添加量不要超过 PCR 反应体系的 1/10，50  $\mu$ l PCR 反应体系中 RT 产物的加入量为 2-3 $\mu$ l，不要超过 5 $\mu$ l。

| Cycle step           | Temperature        | Time        | Cycles |
|----------------------|--------------------|-------------|--------|
| Initial denaturation | 98 $^{\circ}$ C    | 1min        | 1      |
| Denaturation         | 98 $^{\circ}$ C    | 5-10sec     | 25-40  |
| Annealing            | 50-72 $^{\circ}$ C | 10-20sec    |        |
| Extension            | 72 $^{\circ}$ C    | 10-30sec/kb |        |
| Final extension      | 72 $^{\circ}$ C    | 5 min       | 1      |
|                      | 4 $^{\circ}$ C     | Hold        |        |

#### PCR 循环设置

##### NOTE:

Xerox DNA 聚合酶具有的很高热稳定性，可以用 98 $^{\circ}$ C 预变性，对于大多数模板而言，98 $^{\circ}$ C 预变性 1 min 就足够了，预变性不要超出 3 min。当然也可以按照常规方法使用 94 $^{\circ}$ C 变性 2-5 min。血液直接扩增时，预变性可设置 95 $^{\circ}$ C 10 min，让细胞裂解并释放 DNA。

在循环扩增时，98 $^{\circ}$ C 变性持续时间可以设定 5-10sec，简单模板 5 sec，复杂模板 10 sec。

一般条件下，可以采用如上表所列的三温度梯度循环的 PCR 扩增方法，引物的退火温度为两条引物中较低  $T_m$ -5，引物的退火持续时间可以设定 10-20sec。当两条引物的  $T_m$  值都大于等于 70 $^{\circ}$ C 时，而且都使用了长引物，可以使用两步法来扩增，两步法中退火温度和延伸温度都为 72 $^{\circ}$ C。

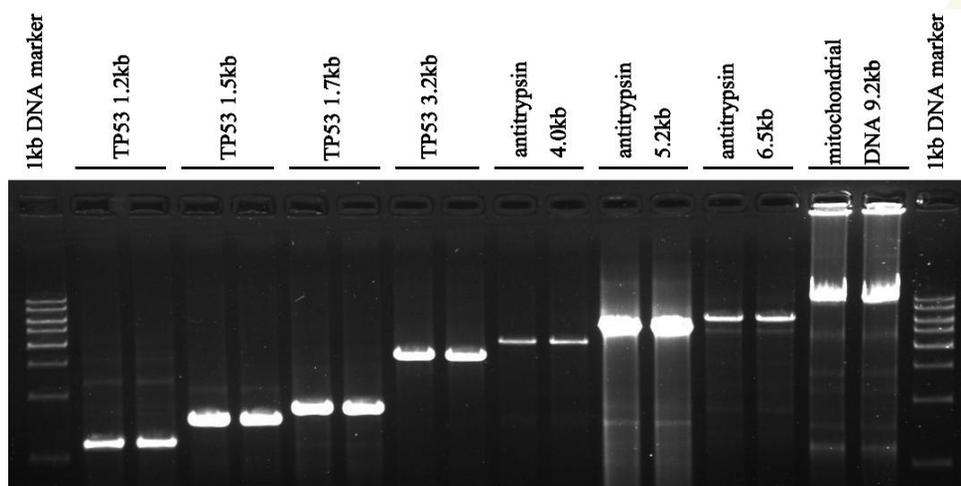
Xerox DNA 聚合酶的最佳延伸温度是 72 $^{\circ}$ C。延伸所需要的时间依赖于扩增产物的长度和复杂度。对于质粒，BAC 这类简单模板，可以使用 15sec/kb 延伸速度，对于高复杂性的基因组 DNA，可以使用 30sec/kb 延伸速度。扩增 1kb 以下的产物时，延伸时间不要超过 40 sec。

#### 结果检测：

PCR 反应结束后，5-10 $\mu$ l 扩增产物用含 0.5  $\mu$ g/ml 溴化乙锭（或合适浓度的其它 DNA 染色试剂），合适浓度的琼脂糖凝胶电泳检测，电泳完成后在紫外透射仪下观察并记录结果。

#### 实验例一

以人基因组 DNA (HeLa) 为模板，按照 30 sec/kb 的延伸速度，三步循环 PCR 法成功扩增出不同长度的 DNA 序列。



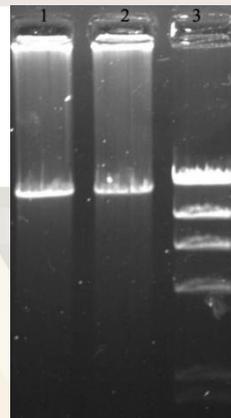
### 实验例二

人线粒体 DNA 是一个 16.6kb 长度的环状双链 DNA 分子。线粒体基因组的遗传变化与人类的一些癌症、糖尿病和心血管疾病等疾病有密切的联系。线粒体全基因组的 PCR 扩增和测序可以检测到线粒体基因组的缺失与否,有助于充分了解线粒体的基因组的实际情况。Xerox DNA 聚合酶可以在较短的时间内,较小的酶量一次性扩增出线粒体全长基因组 DNA,为线粒体基因组相关研究人员提供了一种新的扩增酶。

扩增条件 98°C 预变性 1min, 然后按照 98°C/10sec-60°C/20 sec-72°C/8 min 循环运行 30 次,后延伸 10min。

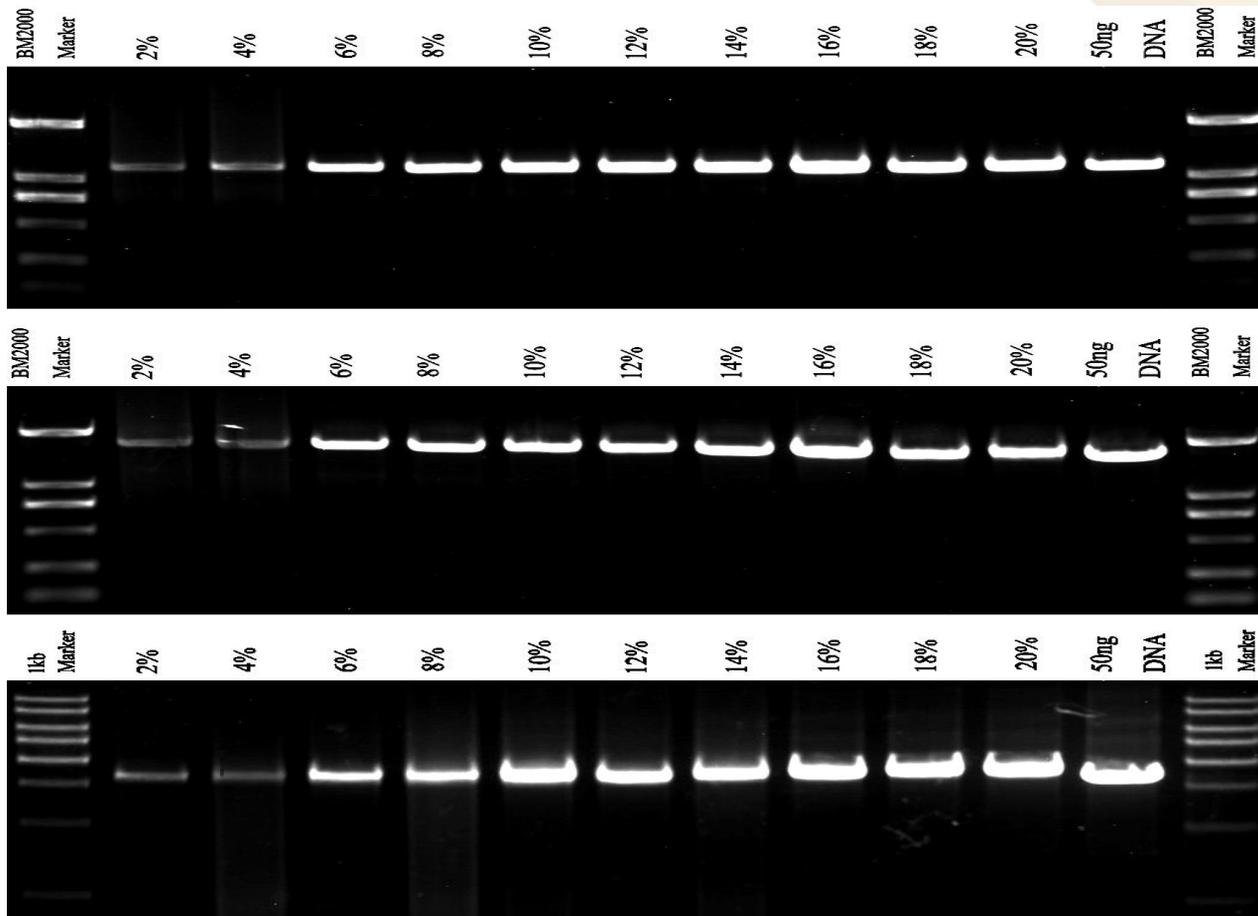
Lane 1-2. 人线粒体全基因组 DNA (16.6kb)

Lane 3.  $\lambda$  DNA/*Hind* III DNA Marker



### 实验例三

50 $\mu$ l 体系中分别加入 1 至 10 $\mu$ l 的 EDTA 抗凝人全血直接做模板 (血液终浓度为 2%-20%, 最后一个泳道为 50ng 纯化的 DNA 对照)。95°C 预变性 10 min, 98°C 变性 10 sec, 60°C 退火 20 sec, 72°C 按 30 sec/kb 的延伸速度, 40 个循环, 可以扩增出 1.2kb 和 3.2kb 长度的 TP53 DNA。如图所示聚合酶活性不受血液的影响, 而扩增量随着血液量的增加而变大。



常见问题与对策

| 常见问题                         | 对策  |
|------------------------------|---|
| <p>没有扩增产物</p> <p>或跨增产量过低</p> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1、确认加样有没错误</li> <li>2、退火温度太高，可以降低退火温度，或用梯度 PCR 仪找到最佳的退火温度。</li> <li>3、模板量太小，需要增加模板量</li> <li>4、增加延伸时间，按 40sec/kb 进行扩增</li> <li>5、直增加扩增循环数，可以加到 40cycles</li> <li>6、优化酶的使用量，增加酶用量的 0.5 倍</li> <li>7、适当增加 Mg<sup>2+</sup>离子浓度</li> <li>8、使用高质量的 dNTPs</li> </ol> |
| <p>非特异性扩增</p>                | <ol style="list-style-type: none"> <li>1、降低酶的使用量，按原来用量的一半使用</li> <li>2、降低延伸时间</li> <li>3、降低模板量</li> <li>4、降低总的扩增循环数</li> <li>5、提高退火温度或使用两步法 PCR</li> <li>6、优化 Mg<sup>2+</sup>离子浓度</li> <li>7、降低引物使用量</li> <li>8、重新设计引物</li> </ol>   |