



Xerox DNA Polymerase

产品信息:

组成	AT109
Xerox DNA Polymerase (2.5 U/μl)	100 U
5× Xerox Buffer	1 ml
5× Green Xerox Buffer	1 ml
5× High GC Enhancer	1 ml
25mM MgSO ₄	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°C 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 Reaction	50μl Reaction	Final 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)	5μl	10μl	1×
Xerox DNA Polymerase	0.25-0.5μl	0.5-1μl	0.025-0.05U/μl

Note:

5× Xerox Buffer 中含有 10mM 的 MgSO₄, 通常 PCR 反应的最终 Mg²⁺ 浓度为 2mM 就足够了。如需优化 Mg²⁺ 浓度, 可以按 0.5mM 的浓度梯度补加 MgSO₄。例如, 50μl 反应体系中, Mg²⁺ 最终浓度要为 2.5mM, 那么需要额外补加 1μl 体积的 25mM MgSO₄。

5× High GC Enhancer 用于高 GC 含量的 DNA 模板的 PCR 扩增, 不含 MgSO₄, 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/μl。

扩增模板:

- 1.低复杂基因组模板（质粒、病毒、λDNA 和 BAC DNA 等）,50μl 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，50μl 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 μl PCR 反应体系中 RT 产物的加入量为 2-3μl，不要超过 5μl。

Cycle step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	98°C	1min	1
Denaturation	98°C	5-10sec	25-40
Annealing	50-72°C	10-20sec	
Extension	72°C	10-30sec/kb	
Final extension	72°C	5 min	1
	4°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°C 预变性，对于大多数模板而言，98°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°C 变性 2-5 min。血液直接扩增时，预变性可设置 95°C 10 min，让细胞裂解并释放 DNA。

在循环扩增时，98°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°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°C。

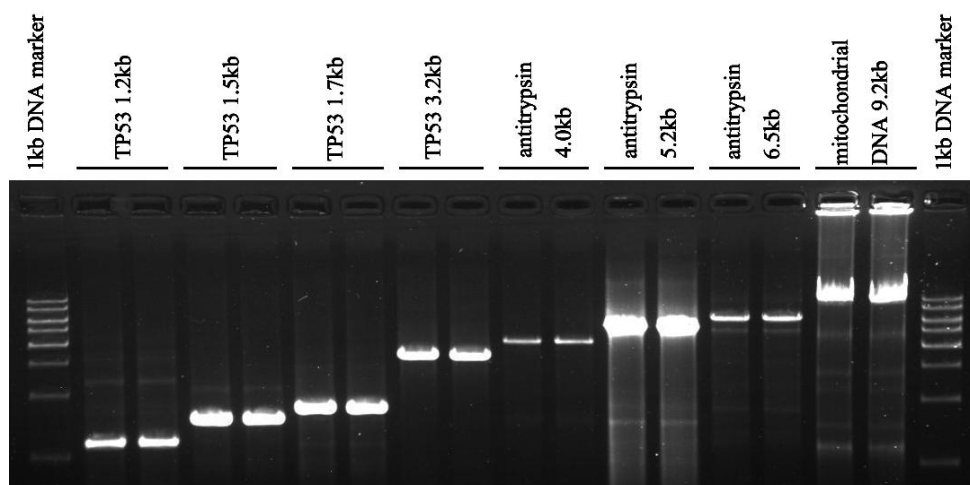
Xerox DNA 聚合酶的最佳延伸温度是 72°C。延伸所需要的时间依赖于扩增产物的长度和复杂度。对于质粒，BAC 这类简单模板，可以使用 15sec/kb 延伸速度，对于高复杂性的基因组 DNA，可以使用 30sec/kb 延伸速度。扩增 1kb 以下的产物时，延伸时间不要超过 40 sec。

结果检测:

PCR 反应结束后，5-10μl 扩增产物用含 0.5 μg/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。



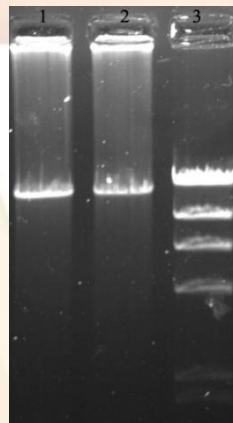
实验例二

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。

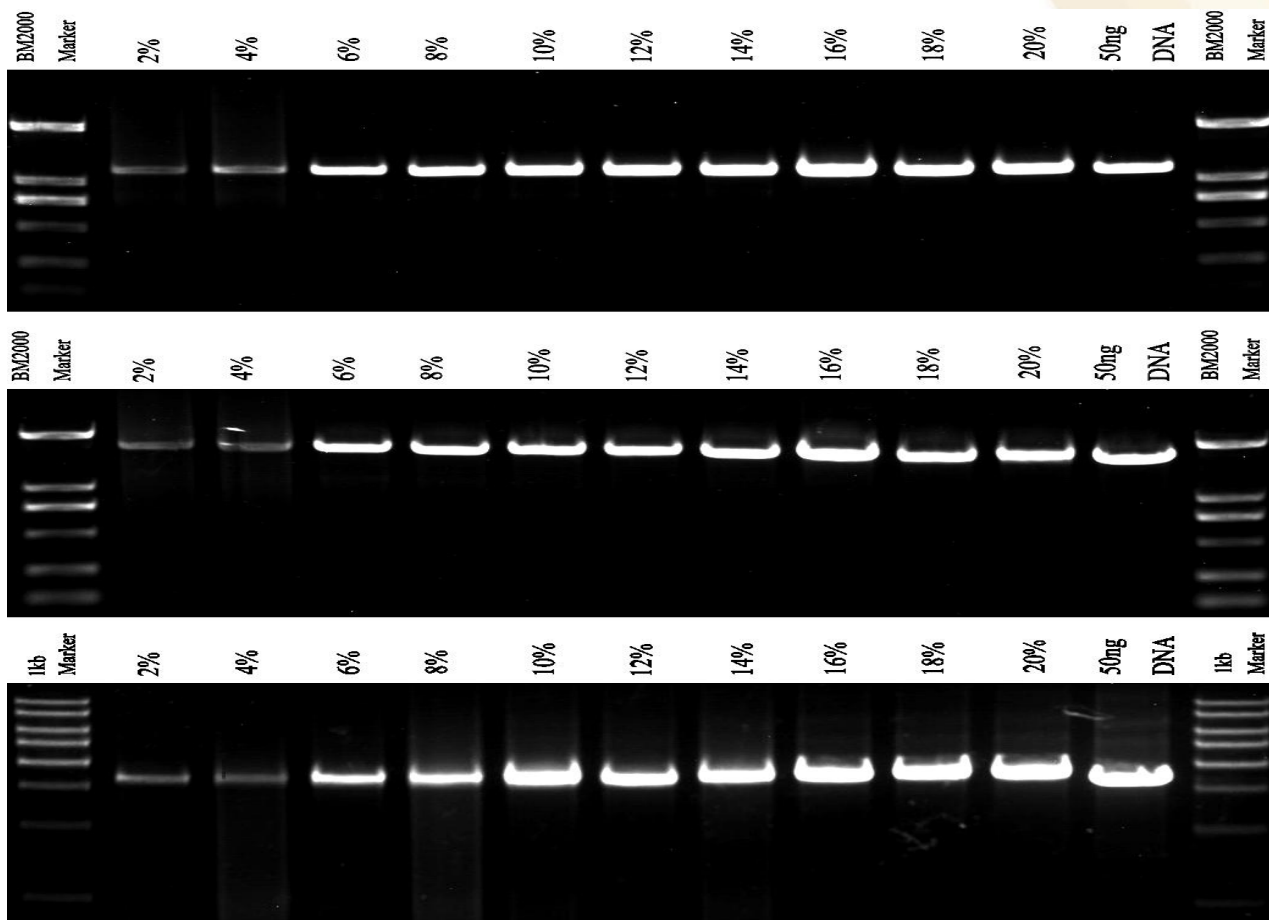
Lane 1-2.人线粒体全基因组 DNA (16.6kb)

Lane 3. λ DNA/*Hind* III DNA Marker



实验例三

50μl 体系中分别加入 1 至 10μl 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, 1.7kb 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"> 1、确认加样有没错 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。 3、模板量太小，需要增加模板量 4、增加延伸时间，按 40sec/kb 进行扩增 5、直增加扩增循环数，可以加到 40cycles 6、优化酶的使用量，增加酶用量的 0.5 倍 7、适当增加 Mg^{2+} 离子浓度 8、使用高质量的 dNTPs
<p>非特异性扩增</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、降低酶的使用量，按原来用量的一半使用 2、降低延伸时间 3、降低模板量 4、降低总的扩增循环数 5、提高退火温度或使用两步法 PCR 6、优化 Mg^{2+} 离子浓度 7、降低引物使用量 8、重新设计引物