

T4 UvsY Protein

产品编号	产品名称	包装
D7061S	T4 UvsY Protein	100μg
D7061M	T4 UvsY Protein	500μg
D7061L	T4 UvsY Protein	2mg

产品简介:

- 碧云天生产的T4 UvsY Protein, 也称T4 UvsY蛋白, 即T4重组载体蛋白(T4 Recombination Mediator Protein), 是由碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台通过大肠杆菌表达、纯化获得的一种来源于T4噬菌体在T4噬菌体重组系统扮演中心作用的重要蛋白。UvsY通过促进T4 UvsX Recombinase和单链DNA (ssDNA)的细丝组装、帮助UvsX置换结合在ssDNA上的T4 gp32 Protein而刺激UvsX的重组酶活性。在模拟生理条件的盐浓度和gp32浓度下, UvsY对UvsX的催化活性至关重要。UvsY缺陷的T4噬菌体和UvsX缺陷的T4噬菌体具有类似的重组缺陷表型, 表明UvsX重组酶的生物活性依赖于UvsY[1]。
- T4 UvsY Protein可用于重组酶聚合酶扩增(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)。RPA技术不需要对模板进行热变性预处理, 可以在恒定的温度下(37-42°C)进行, 扩增时间也较短, 相较于其他的PCR技术具有灵敏、快速和特异的优点[2][3]。RPA技术可用于开发多种DNA和RNA病原体的检测方案, 包括MERS (中东呼吸综合征)、HIV-11、埃博拉病毒以及COVID-19, 检测下限通常低于100个拷贝。越来越多的证据表明, RPA技术可以作为开发新的诊断工具的一种潜在方法, 具有及时、准确、具体的特点[4]。
- RPA反应需要以下组分: 重组酶T4 UvsX Recombinase (D7059), 重组酶载体因子T4 UvsY Protein (D7061), ssDNA结合蛋白T4 gp32 Protein (D7057), 以及DNA聚合酶(如*Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment) (D7055)等。引物与模板的结合不需要通过退火来实现, 而是在UvsY和ATP的帮助下, UvsX与引物结合形成一种核酸蛋白复合物, 在双链DNA (dsDNA)中寻找同源序列。一旦被定位到同源序列, 核酸蛋白复合物就会侵入dsDNA, 形成D环结构, 启动链交换反应, 未被结合的链则被gp32稳定, 防止引物解离。接下来, DNA聚合酶从引物的3'端延伸出一条互补链, 完成双链的复制, 整个过程循环进行。RPA反应除了以上核心蛋白还需要ATP (D7378)、肌酸激酶(Creatine Kinase)以及磷酸肌酸(Phosphocreatine)等作为能量提供系统。肌酸激酶的作用是ATP再生, 它可以将磷酸肌酸和ADP转化为肌酸和ATP[5, 6]。
- 碧云天T4 UvsY Protein在RPA反应中的作用请参考图1。

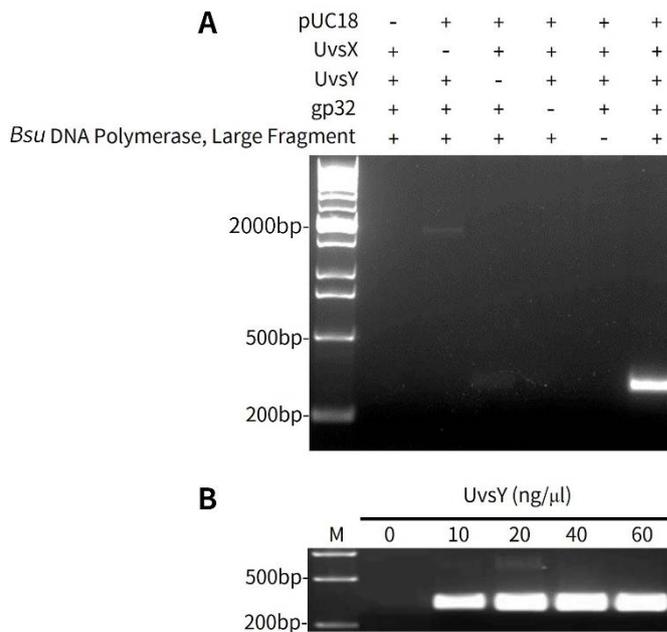


图1. 碧云天T4 UvsY Protein (D7061)在RPA反应中的作用效果图。以pUC18为模板, 使用正向引物Primer-F (5'-AGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCC-3')和反向引物Primer-R (5'-TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACA-3')进行RPA反应。配制50μl反应体系: 50mM Tris-HCl (pH7.9), 2mM DTT, 100mM Potassium Acetate, 7.5% (w/v) PEG8000, 30mM Phosphocreatine, 100ng/μl Creatin Kinase, 3mM ATP, 200μM dNTPs, 50ng pUC18, 500nM Primer-F, 500nM Primer-R, 200ng/μl UvsX (D7059), 60ng/μl UvsY (D7061), 600ng/μl gp32

(D7057), 0.4U/μl *Bsu* DNA Polymerase, Large Fragment (D7055), 14mM Magnesium Acetate。设置无pUC18的阴性对照, 以及无UvsX、无UvsY、无gp32和无*Bsu* DNA polymerase, Large Fragment的对照。配制好反应体系后, 最后统一将2.5μl浓度为0.28M的Magnesium Acetate加到管壁上, 离心以启动反应, 39°C孵育30分钟, 随后60°C加热10分钟。反应结束后离心, 从每管取出4μl样品, 分别加入0.8μl DNA上样缓冲液(6X) (D0071), 然后电泳并进行核酸染色和荧光成像分析, 产物为长度为293bp的片段。图A表明UvsX、gp32、*Bsu* DNA polymerase, Large Fragment对于RPA反应都是必需的。当体系中不含UvsY时, 可以观察到微弱的条带, 说明UvsY可以提高RPA反应的效率。图B展示了不同浓度UvsY在RPA反应中的作用, RPA反应产物的量随UvsY浓度的升高而增多, 当体系中UvsY的终浓度为40ng/μl时, 产物的量达到饱和且条带单一。实际效果会因样品种类、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **来源:** 由大肠杆菌表达, 表达基因为T4噬菌体的UvsY基因。
- **分子量:** 约17kDa。
- **纯度:** 不含DNA内切酶和外切酶, 不含核糖核酸酶。
- **Storage (Dilution) Buffer:** 20mM Tris-HCl (pH8.0), 500mM NaCl, 5mM DTT, 0.1mM EDTA, 50% Glycerol。
- **失活或抑制:** 60°C孵育10分钟可使T4 UvsY Protein失活。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7061S-1	T4 UvsY Protein (2mg/ml)	50μl
D7061S-2	Storage (Dilution) Buffer	200μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7061M-1	T4 UvsY Protein (2mg/ml)	250μl
D7061M-2	Storage (Dilution) Buffer	1ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7061L-1	T4 UvsY Protein (2mg/ml)	1ml
D7061L-2	Storage (Dilution) Buffer	4ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 两年有效, 避免反复冻融。

注意事项:

- 配制反应体系时, 会出现白色沉淀, 属于正常现象, 不影响实验结果。
- 该产品在常温下即可反应, 配制反应体系时需在冰上操作。
- 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. 设计引物。

根据需要检测的模板设计对应的RPA正反向引物, 引物设计一般遵循几项原则:

- a. 引物长度一般在30-35bp, GC含量应在30%-70%之间;
- b. 引物的5'端避免连续的鸟嘌呤(G), 且最好有胞嘧啶(C);
- c. 引物的3'端是鸟嘌呤(G)或胞嘧啶(C), 可以提高引物和模板结合的效率[6]。

2. RPA体系配制及检测。

- a. 在冰浴中配制RPA反应体系。

注: RPA反应在常温下也可以进行, 配制时需全程冰浴。一旦加入Magnesium Acetate, RPA反应就会开始, 因此Magnesium Acetate最后加到管壁上, 反应前将Magnesium Acetate统一离心到管底, 启动反应。

- b. 反应条件: 39°C孵育30分钟。
- c. 60°C加热10分钟使酶失活。
- d. 电泳检测。离心数秒, 每管取4μl样品, 每个样品中加入0.8μl DNA上样缓冲液(6X) (D0071), 混匀体系后全部上样, 进行1.5%琼脂糖凝胶电泳, 160V电泳20分钟。也可以在反应体系中添加显色剂或荧光染料进行显色反应或实时荧光检测。

参考文献:

1. Xu H, Beernink HT, Morriscal SW. *Nucleic Acids Res.* 2010. 38(14):4821-4833.
2. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL. *PLoS Biol.* 2006. 4(7):e204.

3. Kojima K, Juma KM, Akagi S. J Biosci Bioeng. 2021. 131(2):219-224.
4. Palmieri D, Javorina A, Siddiqui J. J Biosci Bioeng. 2022. 12(1):4082.
5. Olaf Piepenburg, Colin H, WilliamsNiall A. Methods for multiplexing recombinase polymerase amplification. US7435561B2 [P], 1993.
6. Li J, Macdonald J, von Stetten F. Analyst. 2018. 144(1):31-67.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7055S	<i>Bsu</i> DNA Polymerase, Large Fragment	200U
D7055M	<i>Bsu</i> DNA Polymerase, Large Fragment	1000U
D7057S	T4 Gene 32 Protein (ssDNA结合蛋白)	100μg
D7057M	T4 Gene 32 Protein (ssDNA结合蛋白)	500μg
D7057L	T4 Gene 32 Protein (ssDNA结合蛋白)	2mg
D7371	dNTP Mixture (2.5mM each)	1ml
D7373	dNTP Mixture (25mM each)	250μl
D7378-250μl	ATP (100mM, Nuclease free)	250μl
D7378-1ml	ATP (100mM, Nuclease free)	1ml
D7378-5ml	ATP (100mM, Nuclease free)	5ml
D7059S	T4 UvsX Recombinase	100μg
D7059M	T4 UvsX Recombinase	500μg
D7059L	T4 UvsX Recombinase	2mg
D7061S	T4 UvsY Protein	100μg
D7061M	T4 UvsY Protein	500μg
D7061L	T4 UvsY Protein	2mg
ST043-1g	DTT	1g
ST043-5g	DTT	5g
ST043-25g	DTT	25g
ST043-100g	DTT	100g
ST483	PEG8000	500g
ST1483-100g	乙酸镁四水合物(99%, Reagent grade)	100g
ST1483-500g	乙酸镁四水合物(99%, Reagent grade)	500g
ST1591-50g	乙酸钾(≥99.0%, Reagent grade)	50g
ST1591-250g	乙酸钾(≥99.0%, Reagent grade)	250g
ST1591-1kg	乙酸钾(≥99.0%, Reagent grade)	1kg

Version 2024.04.07