

BeyoFusion™ DNA Polymerase

产品编号	产品名称	包装
D7220	BeyoFusion™ DNA Polymerase	200U

产品简介:

- 碧云天生产的BeyoFusion™ DNA Polymerase, 是一种以嗜热古细菌DNA聚合酶(hyperthermophilic archaeon Pyrococcus-like DNA polymerase)为基础通过突变等改造而获得的超高性能DNA聚合酶, 它具有扩增速度快、保真度极高、扩增片段可以轻松达到12kb等优点。
- BeyoFusion™ DNA Polymerase**扩增速度极快**, 扩增小于6kb的DNA片段时, 延伸1kb只需要15秒(参考表1)。普通的DNA聚合酶延伸1kb通常需要1-2分钟。BeyoFusion™ DNA polymerase由于其超快的扩增速度, 可以显著缩短PCR扩增所需的时间。
- BeyoFusion™ DNA Polymerase是一种**高保真DNA聚合酶**。BeyoFusion™ DNA Polymerase不仅可以非常高效地催化5'至3'方向的依赖于DNA模板的脱氧核苷酸的聚合反应, 它还同时具有3'至5'的外切酶活性(proofreading activity), 它的错误发生概率比Taq酶要低52倍, 比pfu酶要低6倍(参考表1)。

表 1. BeyoFusion™ DNA polymerase 的主要性能与 Taq 酶及同类产品的比较。

Product Name	Concentration	Manufacture	Velocity	Target Size	Fidelity	Product end
Taq	5U/μl	Various	1min/kb	<3kb	2.3×10^{-5} /nt/cycle	3'overhangs
Pfu	5U/μl	Various	2min/kb	<5kb	2.6×10^{-6} /nt/cycle	Blunt
Platinum Taq	5U/μl	Thermo	30s/kb	15kb	3.8×10^{-6} /nt/cycle	3'overhangs
Phusion HF	2U/μl	Thermo	15-30s/kb	20kb	4.4×10^{-7} /nt/cycle	Blunt
LongAmp Taq	2.5U/μl	NEB	50s/kb	30kb	1.2×10^{-5} /nt/cycle	3'overhangs
Phusion HF	2U/μl	NEB	15-30s/kb	20kb	4.6×10^{-7} /nt/cycle	Blunt
PfuUltra HF	2.5U/μl	Agilent	1-2min/kb	17kb	1.3×10^{-6} /nt/cycle	Blunt
PfuUltra II FH	-	Agilent	15-30s/kb	19kb	1.2×10^{-6} /nt/cycle	Blunt
KOD Dash	2.5U/μl	TOYOBO	30s/kb	18kb	5.8×10^{-6} /nt/cycle	3'overhangs
KOD FX	1U/μl	TOYOBO	30s-1min/kb	40kb	2.1×10^{-6} /nt/cycle	Blunt
BeyoFusion™	2.5U/μl	Beyotime	15-60sec/kb	>12kb	4.4×10^{-7}/nt/cycle	Blunt
BeyoFusion™ Plus	2.5U/μl	Beyotime	15-60sec/kb	>12kb	2.2×10^{-6}/nt/cycle	3' overhangs

- BeyoFusion™ DNA Polymerase的**扩增长度长**, 可以达到**12kb**。BeyoFusion™ DNA Polymerase非常适合长片段DNA的扩增, 扩增出来的片段可以轻松达到12kb(参考图1和表1), 更长片段的扩增效果未经测试。BeyoFusion™ DNA聚合酶可以轻松胜任具有复杂二级结构的、非常长的DNA片段的准确扩增, 因此它是目的基因扩增和克隆的理想选择。

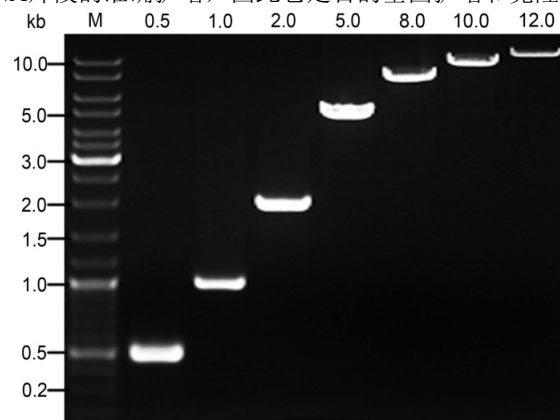


图1. BeyoFusion™ DNA polymerase以λDNA为模板, PCR扩增不同长度(0.5-12kb)片段的电泳图。

- **来源:** BeyoFusion™ DNA polymerase通过大肠杆菌重组、表达、纯化而获得。
- **用途:** 高保真PCR (high fidelity PCR)、点突变、PCR克隆等。BeyoFusion™ DNA polymerase扩增出来的DNA片段为双平端(参考表1), 可以直接用于双平端克隆, 但不能直接用于常规的T载体克隆。如需用于T载体克隆, 需在BeyoFusion™ DNA polymerase PCR扩增结束后加入常规量的普通Taq酶在72°C反应5-10分钟, 使每条链的3'端加上一个A以形成粘端。
- **活性定义:** One unit is defined as the amount of enzyme that will incorporate 10 nmol of dNTP into acid insoluble material in 30

minutes at 74°C.

- **纯度:** 不含DNA内切酶、外切酶和磷酸酯酶, 不含RNA酶, 满足常规PCR反应要求。
- **酶储存溶液:** 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 100mM KCl, 200µg/ml BSA and 50% (v/v) glycerol。
- **失活或抑制:** 酚氯仿抽提可以使BeyoFusion™ DNA polymerase失活。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7220-1	BeyoFusion™ DNA polymerase (2.5U/µl)	80µl
D7220-2	10X BeyoFusion™ Buffer (with Mg ²⁺)	0.5ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存。

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BeyoFusion™ 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, 可以先配制大体积的包含水、buffer、dNTP和BeyoFusion™ DNA polymerase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引物):

试剂	扩增片段小于6kb		扩增片段大于6kb	
	最终浓度	体积	最终浓度	体积
双蒸水或Milli-Q水	-	(36.5-x)µl	-	(29-y)µl
10X BeyoFusion™ Buffer (with Mg ²⁺)	1X	5µl	1X	5µl
dNTP (2.5mM each)	0.25mM each	5µl	0.5mM each	10µl
模板DNA	10pg-1µg*	xµl	10pg-1µg*	yµl
引物混合物(10µM each)	0.2µM each	1µl	0.4µM each	2µl
BeyoFusion™ DNA polymerase	2.5U/50µl	1µl	2.5U/50µl	1µl
总体积	-	50µl	-	50µl

*对于不同类型的模板在50µl反应体积中推荐用量如下: 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产物。

注意: 参考上表, 在扩增大于6kb的片段时dNTP和引物的用量比扩增小于6kb片段时加倍。

- 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(mineral oil, ST275)。
- 各设置好的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:

PCR步骤	扩增片段小于6kb时	扩增片段大于6kb时
STEP1(起始变性)	92°C 3min	92°C 3min
STEP2(变性)	92°C 30sec	92°C 30sec
STEP3(退火)	55°C 30sec	55°C 30sec
STEP4(延伸)	68°C 15s/kb	68°C 1min/kb
STEP5(循环)	Go To STEP2 for 30 cycles	Go To STEP2 for 30 cycles
STEP6(最终延伸)	68°C 10min	68°C 15min
STEP7(临时保存)	4°C forever	4°C forever

- 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(延伸)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。
- 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。
- 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。
- 对PCR引物进行脱盐纯化。
- 使用高质量的dNTP混合物。
- 适当增加DNA polymerase的用量。
- 当产生较多非特异性条带时，可以适当提高退火温度。
- 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。

- 退火温度提高 2-5°C。
- 减少 DNA 模板的用量。
- 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。
- 适当减少 BeyoFusion™ DNA polymerase 用量。
- 适当缩短延伸时间。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
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
-------	--	------

Version 2017.02.21