

BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase

产品编号	产品名称	包装
D7213S	BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase	200U
D7213M	BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase	1000U

产品简介:

- 碧云天生产的BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase, 是一种通过基因重组改造而获得的具有超强(4kb/min)、超长(35kb)扩增能力的高度热稳定的DNA聚合酶, 具有扩增速度极快, 保真度极高, 短时间内即可轻松实现35kb λDNA片段扩增等突出优点(参考图1)。推荐用于5kb甚至30kb以上长片段的PCR扩增。
- BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase使用单体酶完成超长片段扩增。同类产品如NEB的LongAmp® Taq DNA Polymerase、Thermo的Scientific Extensor Long Range PCR Enzyme Mix、Promega的GoTaq® Long PCR Master Mix等进行超长片段扩增大多采用双酶体系, 即结合具有强扩增能力的DNA聚合酶和具有校对功能的DNA聚合酶来实现保真性高的长片段扩增, 而BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase和Thermo的GeneAmp® XL PCR Kit中使用的rTth DNA Polymerase XL (Extra Long)类似, 不需要任何其它酶或者蛋白、多肽等辅助因子, 即可突破单体酶一步完成长片段的扩增。
- BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase扩增速度极快。扩增小于6kb的DNA片段时, 延伸每1kb只需要15秒; 扩增大于6kb的DNA片段时, 延伸每1kb也只需要30秒。BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase由于其超快的扩增速度, 因而可以大大缩短超长片段每个PCR循环的扩增时间。本产品也同样适用于短片段的扩增, 可以实现超快速的PCR扩增。
- BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase是一种高保真DNA聚合酶。它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酶要低100倍, 比pfu酶还要低约9倍。它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。

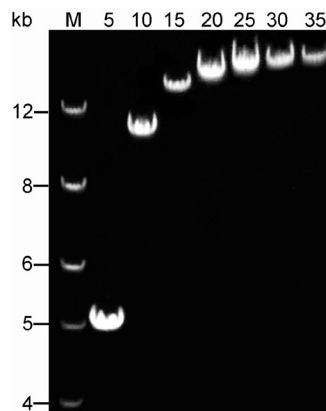


图1. BeyoAmp™ Extra-long DNA polymerase以λDNA为模板, PCR扩增不同长度片段(5-35kb)的电泳图。电泳采用0.8%琼脂糖凝胶, 1XTAE, 100V电泳180分钟。

- BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase的主要性能与Taq酶及同类产品的比较请参考下表。

Product Name	Concentration	Manufacture	Velocity	Target Size	Fidelity	Product end
Taq	5U/μl	Beyotime/others	1min/kb	<3kb	2.3×10^{-5} /nt/cycle	3'overhangs
Pfu	5U/μl	Beyotime/others	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
BeyoAmp™	2.5U/μl	Beyotime	15~30sec/kb	35kb	2.3×10⁻⁷/nt/cycle	Blunt
BeyoAmp™ Plus	2.5U/μl	Beyotime	15~30sec/kb	35kb	1.1×10⁻⁶/nt/cycle	3' overhangs

- **来源:** BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase通过大肠杆菌重组、表达、纯化而获得。
- **用途:** 超长DNA片段的准确高效PCR扩增、常规高保真PCR、点突变、克隆用途的PCR扩增等。BeyoAmp™ Extra-long DNA polymerase扩增出来的DNA片段为双平端，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，推荐选购BeyoFusion™ Plus DNA polymerase。
- **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:** 酚抽提可以使BeyoAmp™ Extra-long DNA polymerase失活。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7213S-1	BeyoAmp™ Extra-long DNA polymerase (2.5U/μl)	80μl
D7213S-2	10X BeyoAmp™ Buffer	400μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7213M-1	BeyoAmp™ Extra-long DNA polymerase (2.5U/μl)	400μl
D7213M-2	10X BeyoAmp™ Buffer	2ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存。

注意事项:

- PCR反应非常灵敏，在使用BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase进行PCR扩增反应时请注意避免微量待扩增DNA的污染，并尽量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BeyoAmp™ Extra-long 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BeyoAmp™ Extra-long 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MilliQ水	-	(36.5-x)μl	-	(42-x-y)μl
10X BeyoAmp™ Buffer	1×	5μl	1×	5μl
dNTP (2.5mM each)	0.25mM	5μl	0.5-0.75mM	xμl
模板DNA	10pg-1μg*	xμl	100-150ng*	yμl
引物混合物(10μM each)	0.2μM each	1μl	0.4μM each	2μl
BeyoAmp™ Extra-long DNA polymerase	2.5U/50μl	1μl	2.5U/50μl	1μl
总体积	-	50μl	-	50μl

*对于不同类型模板DNA的推荐用量如下：哺乳动物基因组DNA 100ng-500ng；大肠杆菌基因组DNA 100pg-100ng；质粒DNA 1ng-20ng。扩增大于25kb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。

- 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。如果用的PCR仪没有热盖，则在管内滴入一滴矿物油(mineral oil, ST275)以防止蒸发。
- 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:

步骤	循环数	温度	扩增片段小于6kb	扩增片段6-25kb	扩增片段大于25kb	说明
----	-----	----	-----------	------------	------------	----

1	1	92°C	3min	3min	3min	最初变性
2	25~35	92°C	30sec	30sec	30sec	变性
		55°C	30sec	30sec		退火
		68°C	15sec/kb	0.5min/kb	0.5min/kb*	延伸
3	1	68°C	10min	15min	15min	延伸、补全
4	1	4°C	forever	forever	forever	暂时存放

说明：上面表格中15sec/kb表示，如果扩增片段是4kb，那么68°C的延伸时间为1分钟。0.5min/kb表示如果扩增片段是4kb，那么68°C的延伸时间为2分钟。*对于大于25kb的长片段PCR，建议采用两步法，将退火/延伸温度合并为68 °C，可显著提高扩增特异性。

- 最初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变性、退火和延伸的温度和时间以及循环数等。
- 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，循环数需要进行适当优化，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1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94°C 2-4min甚至94°C 5min。
- 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。
 - 使用完整、高纯度、高质量的DNA模板，且避免模板反复冻融。长片段DNA反复冻融过程中可能会出现断裂的问题。
 - Mg²⁺浓度较低，或Mg²⁺与dNTP的比例不合适。使用本产品中提供的缓冲液就无需担心镁离子浓度的问题。
 - 根据片段大小选择合适的琼脂糖凝胶浓度和电泳条件。大片段DNA的电泳需要使用低浓度的琼脂糖凝胶和较低的电泳电压，并电泳较长的电泳时间。
 - PCR反应体系中有气泡或者溶液蒸发。

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 BeyoAmp™ Extra-long DNA Polymerase 的用量。
- 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
D7211S	Hot-Start Taq DNA Polymerase	200U
D7211M	Hot-Start Taq DNA Polymerase	1000U
D7211L	Hot-Start Taq DNA Polymerase	5000U
D7213S	BeyoAmp™ Extra-long DNA polymerase	200U
D7213M	BeyoAmp™ Extra-long DNA polymerase	1000U
D7215S	BeyoAmp™ Plus Extra-long DNA polymerase	200U
D7215M	BeyoAmp™ Plus Extra-long DNA polymerase	1000U
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
D7241S	HemoTaq™ DNA Polymerase (Blood-resistant)	200次
D7241M	HemoTaq™ DNA Polymerase (Blood-resistant)	1000次
D7243S	HemoTaq™ HF DNA Polymerase (Blood-resistant)	200次
D7243M	HemoTaq™ HF DNA Polymerase (Blood-resistant)	1000次
D7245	Blood PCR Enhancer (2X)	2ml
D7248S	PlantTaq™ DNA Polymerase (Chlorophyll-resistant)	200次
D7248M	PlantTaq™ DNA Polymerase (Chlorophyll-resistant)	1000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
D7281S	动物组织直接PCR试剂盒	100次
D7281M	动物组织直接PCR试剂盒	500次
D7283S	鼠尾基因型快速鉴定试剂盒	100次
D7283M	鼠尾基因型快速鉴定试剂盒	500次
D7285S	Blood Direct PCR Master Mix (2X)	100次
D7285M	Blood Direct PCR Master Mix (2X)	500次
D7287S	Blood Direct PCR Master Mix (HF, 2X)	100次
D7287M	Blood Direct PCR Master Mix (HF, 2X)	100次
D7289S	Plant Direct PCR Master Mix (2X)	100次
D7289M	Plant Direct PCR Master Mix (2X)	500次
D7371	dNTP Mixture(2.5mM each)	1ml
D7373	dNTP Mixture(25mM each)	250µl
FTUB322	BeyoGold™ PCR管(0.2ml, 凸盖, 透明)	1000个/包
FTUB323	BeyoGold™ PCR管(0.2ml, 凸盖, 透明)	1000个/包,10包/箱
FTUB328	BeyoGold™ PCR八联排管(0.2ml, 凸盖, 透明)	125排/盒
FTUB329	BeyoGold™ PCR八联排管(0.2ml, 凸盖, 透明)	125排/盒,10盒/箱
ST876-100ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml
ST876-500ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	500ml