

phi29 DNA Polymerase

产品编号	产品名称	包装
D7053S	phi29 DNA Polymerase	250U
D7053M	phi29 DNA Polymerase	1kU
D7053L	phi29 DNA Polymerase	5kU
D7053XL	phi29 DNA Polymerase	20kU

产品简介:

- 碧云天生产的phi29 DNA Polymerase, 即phi29 DNA聚合酶, 是一种重组表达纯化的源于枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*噬菌体phi29的DNA聚合酶。phi29 DNA聚合酶具有DNA链置换 (strand displacement) 活性和很强的DNA连续合成能力 (processive synthesis property), 可以合成超过70kb的长度, 常用于在体外进行不依赖于热循环的等温DNA扩增 (isothermal DNA amplification, 也常简称为等温扩增)。
- phi29 DNA Polymerase具有很强的链亲和力, 单次聚合反应可以实现长度超过70kb的连续聚合延伸, 从而适合用于对全基因组进行稳定扩增。phi29 DNA Polymerase虽然可以扩增线状或者环状的双链DNA, 但其底物倾向于单链DNA或单链RNA。phi29 DNA Polymerase具有3' → 5' 外切酶活性, 因此可保证扩增反应的高保真性。
- **用途:** phi29 DNA Polymerase可用于高保真等温PCR、滚环复制(Rolling Circle Replication, RCA), 多重置换扩增(Multiple Displacement Amplification, MDA)和单细胞、病原微生物以及宏基因组(metagenome)的全基因组扩增(Whole Genome Amplification, WGA)、干血斑样本扩增DNA、单细胞基因组扩增、SNP基因分型和STR/微卫星分析等。phi29 DNA Polymerase还可应用于protein-primed DNA扩增、RNA-primed DNA扩增, 以及致死基因的无细胞体系的克隆等相关实验。
- 碧云天生产的phi29 DNA Polymerase在3-16小时内可实现对动物细胞基因组、环状质粒以及线性单链DNA的有效扩增(图1, 图2和图3)。

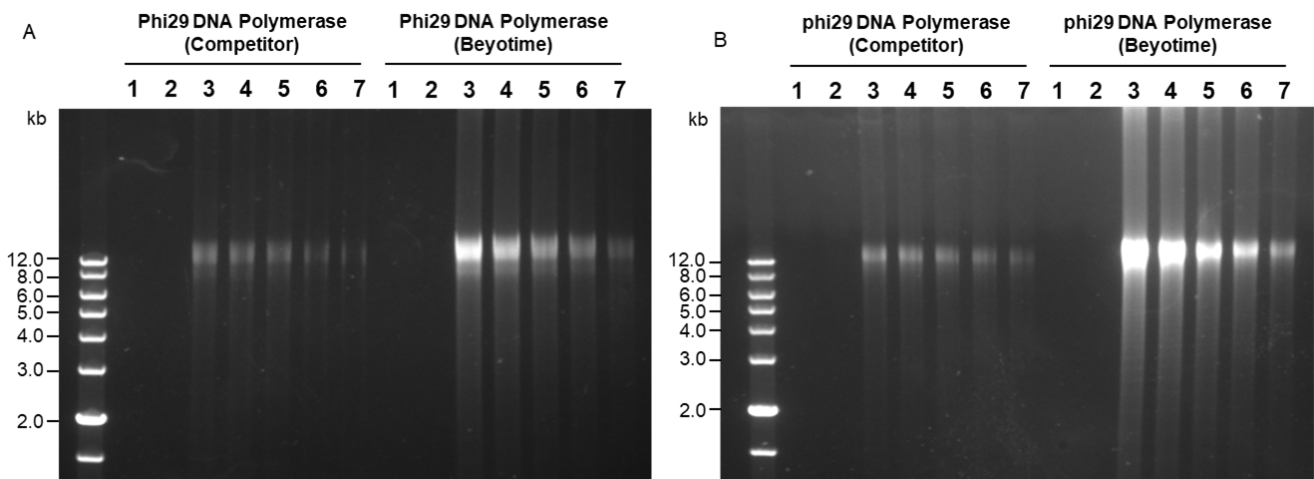


图1. 碧云天生产的phi29 DNA Polymerase和国外N公司的同类产品(Competitor phi29 DNA Polymerase)催化Hela细胞基因组DNA扩增效果对比图。图A为30°C孵育2h效果图, 图B为30°C孵育16h效果图。反应体系为20 μ l: 2 μ l 10X Reaction Buffer, 1 μ l Random Hexamer Primer (100 μ M), 1 μ l dNTP (2.5 mM each), 1 μ l Hela细胞基因组DNA (20 ng/ μ l), 14 μ l Nuclease-free Water, 95°C孵育5 min, 冰浴2 min后加入1 μ l不同稀释倍数 (1、2、4、8、16倍稀释)的phi29 DNA Polymerase, 反应完毕后, 加入4 μ l 6X DNA Loading buffer (D0071, Beyotime), 取10 μ l反应产物, 使用1%琼脂糖凝胶电泳检测其扩增效果。1. 未添加Hela细胞基因组DNA但加入正常量的phi29 DNA Polymerase; 2. 未添加phi29 DNA Polymerase; 3-7分别为phi29 DNA Polymerase的稀释倍数为1、2、4、8和16倍。从上图的检测效果来看, 碧云天生产的phi29 DNA Polymerase能很好地扩增基因组DNA, 并且其扩增效果优于国外N公司的同类产品。

- **来源:** 碧云天生产的phi29 DNA Polymerase由大肠杆菌重组表达*Bacillus subtilis*噬菌体phi29 DNA Polymerase, 并通过纯化所得, 该酶分子量约为67kDa。
- **活性定义:** One unit is defined as the amount of enzyme that will incorporate 0.5 pmol of dNTP into acid insoluble material in 10 minutes at 30°C。

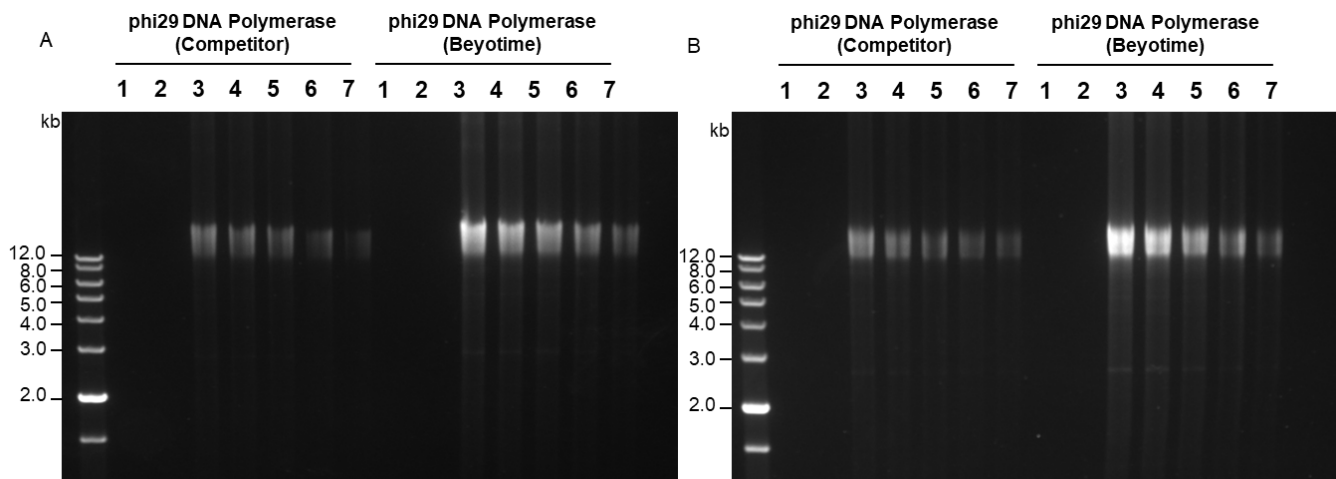


图2. 碧云天生产的phi29 DNA Polymerase和国外N公司的同类产品(Competitor phi29 DNA Polymerase)催化环状质粒DNA pCMV-N-DsRed (4959bp, D2705)扩增效果对比图。图A为30°C孵育2h效果图, 图B为30°C孵育16h效果图。反应体系为20 μ l: 2 μ l 10X Reaction Buffer, 1 μ l Random Hexamer Primer (100 μ M), 1 μ l dNTP (2.5 mM each), 1 μ l 5kb环状质粒DNA (pCMV-N-DsRed, 5 ng/ μ l), 14 μ l Nuclease-free Water, 95°C孵育5 min, 冰浴2 min后加入1 μ l不同稀释倍数 (1、2、4、8、16倍稀释)的phi29 DNA Polymerase, 反应完毕后, 加入4 μ l 6X DNA Loading buffer (D0071), 取10 μ l反应产物, 使用1%琼脂糖凝胶电泳检测其扩增效果。1. 未添加pCMV-N-DsRed但加入正常量的phi29 DNA Polymerase; 2. 未添加phi29 DNA Polymerase; 3-7分别为phi29 DNA Polymerase的稀释倍数为1、2、4、8和16倍。从上图的检测效果来看, 碧云天生产的phi29 DNA Polymerase能很好地扩增质粒, 并且其扩增效果优于国外N公司的同类产品。

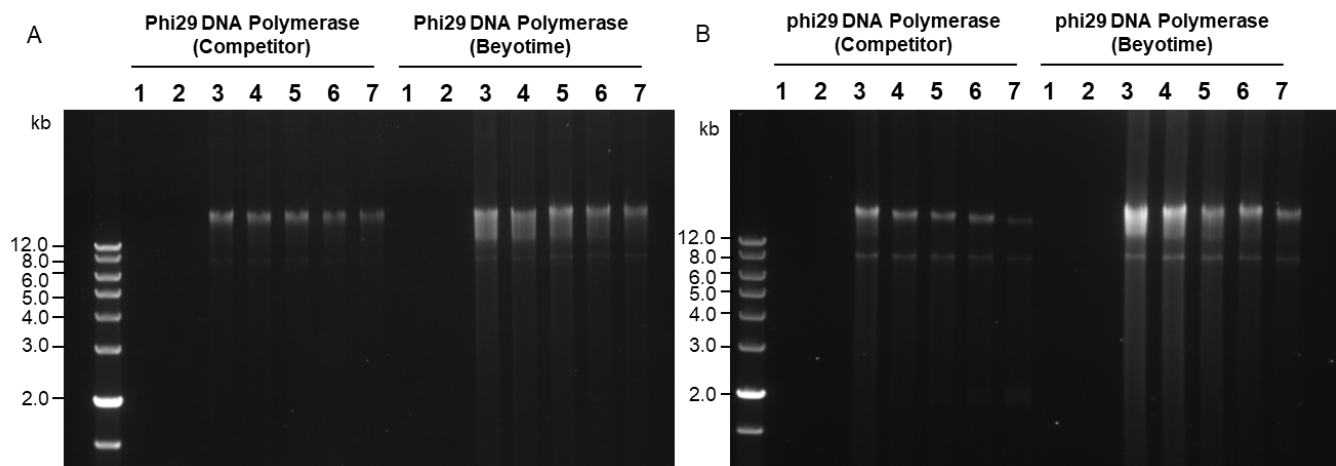


图3. 碧云天生产的phi29 DNA Polymerase和国外N公司的同类产品(Competitor phi29 DNA Polymerase)催化线性单链DNA扩增效果对比图。图A为反应2h效果图, 图B为反应16h效果图。反应体系为20 μ l: 2 μ l 10X Reaction Buffer, 1 μ l Random Hexamer Primer (100 μ M), 1 μ l dNTP (2.5 mM each), 1 μ l M13单链DNA (5ng/ μ l), 14 μ l Nuclease-free Water, 95°C孵育5 min, 冰浴2 min后加入1 μ l不同稀释倍数(1、2、4、8、16倍稀释)的phi29 DNA Polymerase。反应完毕后, 加入4 μ l 6X DNA Loading buffer (D0071, Beyotime), 取10 μ l反应产物, 使用1%琼脂糖凝胶电泳检测其扩增效果。1. 未添加M13单链DNA但加入正常量的phi29 DNA Polymerase; 2. 未添加phi29 DNA Polymerase; 3-7分别为phi29 DNA Polymerase的稀释倍数为1、2、4、8和16倍。从上图的检测效果来看, 碧云天生产的phi29 DNA Polymerase能很好地扩增单链DNA, 并且其扩增效果优于国外N公司的同类产品。

- **10X Reaction Buffer:** 500 mM Tris-HCl (pH7.5 at 25°C), 100 mM MgCl₂, 100mM (NH₄)₂SO₄, 40 mM DTT。
- **酶储存溶液:** 10 mM Tris-HCl (pH7.4 at 25°C), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% (v/v) Glycerol, 0.5% Tween20, 0.5% Nonidet P-40。
- **纯度:** 不含DNA内切酶活性和RNase活性, 不含蛋白酶活性。
- **失活或抑制:** 65°C热孵育10min即可失活。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7053S-1	phi29 DNA Polymerase (10U/ μ l)	25 μ l
D7053S-2	10X Reaction Buffer	100 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7053M-1	phi29 DNA Polymerase (10U/μl)	100μl
D7053M-2	10X Reaction Buffer	300μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7053L-1	phi29 DNA Polymerase (10U/μl)	500μl
D7053L-2	10X Reaction Buffer	1.5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7053XL-1	phi29 DNA Polymerase (10U/μl)	2ml
D7053XL-2	10X Reaction Buffer	6ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，至少一年有效。

注意事项：

- DTT浓度对于phi29 DNA Polymerase活力影响较大，当10X Reaction Buffer储存时间较长或经反复冻融后，可在反应体系中补充DTT至终浓度为5 mM。
- 由于phi29 DNA Polymerase具有较强的3' →5' 外切酶活力，建议合成引物时对其3' 端进行硫代磷酸酯键修饰，或使用高浓度的随机引物，以降低外切酶活力对引物的切割效应。
- phi29 DNA Polymerase具有很高的灵敏度及扩增效率，请使用Nuclease-free的枪头和PCR管，并避免其它反应组分污染。建议在进行扩增反应的同时设置无DNA模板的阴性对照，以确保无外源DNA的污染。若阴性对照出现背景，请先将整个反应体系，除了DNA模板和phi29 DNA Polymerase外，先95°C加热变性2min，然后置于冰浴冷却，随后加入phi29 DNA Polymerase，混匀后30°C孵育30min，以充分利用phi29 DNA Polymerase的外切酶活性去除污染的DNA模板背景，然后再加入DNA模板样品进行预期的扩增。
- 对于酶的操作需在冰浴上进行，以避免酶在室温长时间放置而影响酶的活性。
- 进行等温扩增时，需自备额外的试剂，例如如2.5 mM dNTP、Random Hexamer Primer (100μM)以及Nuclease-free Water等。
- 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. 参考下表，在冰浴上配制反应体系。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-free Water	(15-x)μl	-
10X Reaction Buffer	2 μl	1X
dNTP (2.5 mM each)	1 μl	125μM
Random Hexamer Primers (100μM)	1 μl	5μM
Template DNA (≥1 ng)*	x μl	-
Total Volume	19μl	-

- 上表以 20μl 体系为例，如果有多个类似反应，可以根据实验需求先配制大体积的反应体系，用移液器轻轻吹打或 Vortex 混匀后分装到各 PCR 反应管内。
 - 对于基因组 DNA，建议模板 DNA 的终浓度为 20ng/μl；对于质粒，建议模板 DNA 的终浓度为 5ng/μl；对于 M13 单链 DNA，建议模板 DNA 终浓度为 5ng/μl。
 - 由于 phi29 DNA Polymerase 具有较强的 3' →5' 外切酶活性，如果出现扩增效果不佳的现象，建议将反应体系中的酶量降低至 0.5μl 或 0.25μl。
- 模板 DNA 的预变性：**将上述反应体系置于 PCR 仪中 95 °C 孵育 5min，迅速置于冰浴 2min 或更长时间。
 - 恒温扩增反应：**在冷却的反应体系中加入 1μl phi29 DNA Polymerase，30°C 孵育 2-16h。通常孵育 2h 即可，如果希望获得更大量的扩增产物，可延长孵育时间至 16h。推荐使用恒温水浴锅进行反应，如果使用热盖式 PCR 仪进行反应，请将热盖温度调整为 40°C，以避免酶失活。
 - 终止反应：**65°C 孵育 10 min。
 - 扩增产物的检测：**将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳以检测扩增效果。

Version 2023.11.01