

Pfu DNA Polymerase

产品组成

Cat. No.	8007050	8007100
Pfu DNA Polymerase (5U/μl)	50 μl	100 μl
10 × pfu Buffer	0.5 ml	1 ml
ddH ₂ O	1 ml	1 ml × 2
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

-20℃保存有效期为两年以上。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

Pfu DNA Polymerase 是从含 *Pyrococcus furiosus* DNA Polymerase 基因的重组 E.coli 菌株中分离纯化的热稳定蛋白，分子量约 90KD。具有 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'外切酶活性，能切除延伸过程中嵌入的错配碱基。

Pfu DNA Polymerase 是目前已发现的耐热 DNA 聚合酶中保真性最高的一种。其 PCR 产物为平末端，可直接链接到平末端克隆载体，或者末端加 A 处理后再与 TA 载体连接。

单位定义

74℃，30min，使 10 nm dNTP 掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量定义为 1 个活力单位。

活性检测条件：50 mM Tris-HCl (pH 9.0, 25℃)，50 mM NaCl，5 mM MgCl₂，0.2 mM each dNTPs (包括 [3H]-Dttp)，200 μg/ml 活化的小牛胸腺 DNA 和 0.1 mg/ml BSA。

质量控制

SDS-PAGE 检测纯度大于 99%。经检测无外源核酸酶活性，PCR 方法检测无宿主 DNA 残留，能有效扩增人类基因组中的单拷贝基因。

PCR 体系成分

- 模板 DNA 的纯度：很多残留的核酸提取试剂会影响 PCR 反应，包括蛋白酶、蛋白变性剂(比如 SDS、胍盐)、高浓度盐(KAc、NaAc、辛酸钠等)和高浓度 EDTA 等。纯度不高的模板(比如煮沸法获取的模板)用量请勿超过 PCR 反应体系的 1/10 (比如 50 μl 反应体系中加入模板的体积不应超过 5μl)。如果模板 DNA 纯度太差，可使用新景 (Simgen) PCR 清洁试剂盒 (Cat. No.2101050) 对模板 DNA 进行纯化及浓缩。经新景 (Simgen) PCR 清洁试剂盒纯化后的模板使用量可多至 PCR 反应体系体积的 1/2。
- 模板 DNA 用量：极微量的 DNA 也可以作为 PCR 模板，但为保证反应的稳定性，50μl 体系建议使用 10⁴ 拷贝以上的靶序列作为模板。模板 DNA 的推荐用量：

人基因组 DNA:	0.05 μg~0.5 μg/50 μl PCR反应体系
大肠杆菌基因组 DNA:	10 ng~100 ng/50 μl PCR反应体系
λ DNA:	0.5 ng~5 ng/50 μl PCR反应体系
质粒DNA:	0.1ng ~ 10 ng/50 μl PCR反应体系

 如需用扩增产物作为模板再扩增，应至少将扩增产物稀释 1,000 至 10,000 倍后再作为模板使用，否则可能会出现涂抹条带或无特异性条带。
- 引物浓度：一般每条引物配制的浓度为 10 μM (50×)，工作浓度为 0.2 μM。引物过量可能会出现非特异性扩增，引物过少则可能会降低扩增效率。

PCR 参数设置

1. 预变性：一般预变性为 94℃，1~5 min。变性温度过高或时间过长都会损失 Taq 酶的活性。
2. 退火：退火温度是 PCR 的关键，温度过高可能降低产量，温度过低可能会产生引物二聚体或非特异性扩增。初次尝试 PCR 扩增建议尝试低于 T_m 5℃ (如果两条引物 T_m 不同，参考较低的 T_m) 作为退火温度。一般引物合成公司会提供所合成引物的 T_m，也可以根据此公式估算引物 T_m： $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G} + \text{C})$ 。最佳退火温度需要进行梯度 PCR 确定。
3. 延伸：延伸温度通常为 72℃，延伸时间长短取决于目的 DNA 片段长度，以 500 bp/min 计算所需延伸时间，时间过长可能会导致非特异性增加。循环结束后，继续延伸 5~10min，以获得完整的双链产物。
4. 循环数：一般使用 25~35 个循环，低拷贝模板可适当增加循环数。但过多的循环数可能会增加非特异性扩增，却不会增加特异性产物。

使用方法

1. 将 10×pfu Buffer、dNTPs、ddH₂O、模板 DNA 和引物室温解冻，置于冰上。
2. 将解冻后的各个组分上下翻转混合均匀，按下表依次加入各组分配制 PCR 反应体系：

ddH ₂ O	(41.5-n) μl
10×pfu Buffer	5 μl
Primer 1 (10 μM)	1 μl
Primer 2 (10 μM)	1 μl
dNTPs (10 mM each)	1 μl
Pfu DNA Polymerase	0.5 μl
模板	n μl
Total	50 μl

注意：

- 10×pfu Buffer 使用前必须充分混合均匀，否则将影响 PCR 效果。
- Pfu DNA Polymerase 必须在加入 dNTPs 后再加入，否则 Pfu DNA Polymerase 在不含 dNTPs 的条件下可能会启动 3'→5' 外切酶活性，开始降解引物。
- 上述例子为 50 μl 反应体系所加的组分，如果需要其他体积的反应体系，请按比例增减各组分。

3. 手指轻弹 PCR 反应管充分混匀，低速离心数秒使溶液沉降到管底。
4. PCR 反应循环设置举例

94℃ 3 min

94℃ 30 sec
 ※55℃ 30 sec
 § 72℃ 1 min

} 30 Cycles

72℃ 5 min

※以实际最佳退火温度为准。

§ 以500bp/min计算。

5. 结果检测：取 5-10 μl 扩增产物直接进行琼脂糖电泳检测。

* 琼脂糖凝胶浓度与线形 DNA 最佳分辨范围的关系：

琼脂糖浓度	最佳线形 DNA 分辨范围
0.5%	1,000~30,000
0.7%	800~12,000
1.0%	500~10,000
1.2%	400~7,000
1.5%	200~3,000
2.0%	50~2,000