

Pfu DNA 聚合酶

货号: P1021, P1022, P1023, P1024

产品简介

Pfu DNA 聚合酶是极端嗜热性细菌 *Pyrococcus furiosus* 来源的高度热稳定 DNA 聚合酶, 分子量为 90 KD。其保真性是普通 Taq DNA 聚合酶的 10 倍左右。扩增片段的长度可达 5 kb (简单模板)。延伸速度为 1min/kb (70~75°C, 简单模板可达 20s/kb)。该酶具有 5'→3' 聚合酶活性和 3'→5'外切酶活性, 扩增产物具有平末端。

产品组成

Component	P1021	P1022	P1023	P1024
	250U	250U	1,000U	1,000U
Pfu DNA 聚合酶 (5U/μl)	50 μl	50 μl	200 μl	200 μl
10× Pfu Buffer (Mg ²⁺ Plus) [1]	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml × 2	1.25 ml × 2
6× Loading Buffer[2]	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
dNTPs (2.5mM) [3]	-	1 ml	-	1 ml × 2

[1] 10× Pfu Buffer 分为 Mg²⁺ Plus 与 Mg²⁺ Free 两种包装, 可方便选择。如无特别说明提供 10× Pfu Buffer(Mg²⁺ Plus)。Mg²⁺ Free 的 10×Pfu Buffer 提供 25 mM MgCl₂。

[2] 6× Loading Buffer, 如有需要可单独购买 (Cat. #: M9041)。

[3] dNTPs 是 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 等摩尔混合物, P1021/P1023 不含 dNTPs, 如有需要请单独购买 (Cat. #: P9011/P9012/P9013)。

活性定义

一个活性单位 (U) 指用活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物, 在 72°C、30 min 内, 摄入 10 nmol 全核苷酸所需的酶量。

保存条件

-20°C 保存 2 年。

质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: PCR 方法检测无宿主残余 DNA, 能有效扩增人基因组中的单拷贝基因。

应用举例

1. 配制反应体系

请于冰上配置反应体系, 体系大小与组分用量与添加顺序可调整:

Ordinal	Component	Volume (50 μl reaction volume)	Final concentration (50 μl reaction volume)
1	10× Pfu Buffer (Mg ²⁺ Plus)	5 μl	1×
2	dNTPs (2.5mM)	4 μl	0.4 mM
3	upstream primer (10 μM) ^[1]	2 μl	0.4 μM
4	downstream primer (10 μM) ^[1]	2 μl	0.4 μM
5	Pfu DNA 聚合酶 (5U/μl) ^[2]	0.5 μl-1 μl	2.5U-5U
6	template DNA ^[3]	1-4 μl	<1μg
7	超纯水 ^[4]	To 50 μl	-
optional	MgCl ₂ (MgSO ₄)/PCR Enhancer ^[5]	Variable	-

[1] 引物终浓度建议范围: 0.1-1 μM。特异性差时可降低浓度, 效率低时可提高浓度。

[2] 根据目的片段扩增的难易程度调整 DNA 聚合酶的用量。

[3] 不同模板最佳用量不同, 部分 DNA 模板建议用量如下表 (50 μl 反应体系)。

Template	人类基因组 DNA	λDNA	大肠杆菌基因组 DNA	质粒 DNA
Dosage	0.1μg-1μg	0.5ng-5ng	10ng-100ng	0.1ng-10ng

[4] 可单独订购超纯水 (Cat. #: P9021/P9022/P9023)。

[5] 可单独订购 25mM MgCl₂ (Cat. #: P9031) 和 PCR Enhancer (Cat. #: P9041)。

2. 设定反应程序进行 PCR 反应

Stage	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	94°C	3 min	1

Denaturation	94°C	30 sec	25-35
Annealing	55-68°C ^[1]	30 sec	
Extension	72°C	Variable ^[2]	
Final Extension	72°C	5-10 min	1

[1] 退火温度应根据 Tm 值较低的引物来设。

[2] 延伸时间按 1min/kb 来设最佳（简单模板可达 20s/kb）。

3. 分析结果

将产物与 loading buffer 混匀后进行琼脂糖凝胶电泳, 通过凝胶成像设备观察目的条带的扩增情况。如有需要, 可进行割胶回收。

无产物或产物量少的改进措施有: 1 调整退火温度; 2 减少抑制剂的影响, 如提取的基因组 DNA 中含有抑制扩增的成分, 需要高倍稀释 (1: 10000) 后使用; 3 采用乙醇沉降洗脱, 提高模板 DNA 的纯度; 4 使用 PCR 添加剂, 如 PCR Enhancer (Cat. #: P9041)、MgCl₂ (Cat. #: P9031) 等可提高产量。

操作注意事项

1 室温下 Pfu DNA 聚合酶有一定的活性, 为避免发生非特异性扩增, 请于冰上配置反应体系, 并且最后添加 Pfu DNA 聚合酶或模板 DNA。

2 Pfu DNA 聚合酶的扩增产物只有平末端, 可直接用于平末端连接。如要进行 TA 克隆, 请先进行加 A 反应, 以提高克隆效率。(加 A 反应: 参考如下体系, 72°C, 15-30min)

PCR (纯化) 产物	1-7 μl
10× Taq Buffer (Mg ²⁺ Plus)	1 μl
dATP	0.2 mM
Taq DNA 聚合酶	5U
超纯水	To 10 μl

3 碱基出错率是指在每个碱基合成过程中所掺入的错误核苷酸数目。Pfu DNA 聚合酶的碱基错误率为 1×10⁻⁶。

4 dUTP、dITP 和含有这些核苷酸的引物不能用于 Pfu DNA 聚合酶催化的 PCR 扩增。因为该酶与含有尿嘧啶和次黄嘌呤的 DNA 模板结合后会中止 DNA 聚合反应。

引物设计注意事项

引物长度一般在 15-30 个碱基之间; 上下游引物 3'末端避免互补, 避免出现 3 个以上重复的 G 或 C, 或出现发夹结构, 否则会产生非特异性扩增; GC 含量控制在 40-60%, 且上下游引物 GC 含量尽量接近; Tm 值控制在 55-65°C 之间, 且上下游引物 Tm 值尽量接近, 额外附加序列 (酶切位点、修饰等) 是非模板匹配序列, 不参与 Tm 值计算。

本品仅供科学研究使用。