

Pfu DNA Polymerase

产品货号: UBE001A、UBE001B

保存条件: 置于-20℃保存

产品组分:

Cat. No.	UBE001A	UBE001B
Kit Size	100U	250U
Pfu DNA Polymerase (2.5 U/μl)	40 μl	100 μl
10×Pfu PCR Buffer	1 ml	1 ml
dNTPs (10 mM)	100 μl	100 μl

产品介绍:

Pfu DNA Polymerase是通过大肠杆菌表达纯化的重组酶,具有5' -3' DNA聚合酶活性和5' -3' 外切核酸酶活性的同时具有3' -5' 外切核酸酶活性,因此在DNA扩增过程中具有纠错能力,是目前发现的错配率最低的耐高温DNA Polymerase。该酶与*Taq* DNA Polymerase相比具有更好的热稳定性,对于高GC含量模板,提高变性温度对它活性无影响。使用本产品扩增得到的PCR产物的3' 端不带有“A”碱基,不能直接用于T/A克隆,如需进行T/A克隆则需要在其末端添加“A”或用平末端载体进行克隆。本产品适用于基因克隆、基因定点突变、SNP和末端补平等实验。

活性定义:

用活性化的大马哈鱼精子DNA作为模板/引物,在74℃,30分钟内,将10 nmo1脱氧核苷酸掺入到酸性不溶物质所需的酶量定义为1个活性单位(U)。

质量控制:

经过多次柱纯化,SDS-PAGE检测其纯度大于99%;经检测无外源核酸酶活性;PCR方法检测无宿主残余DNA;能有效地扩增人基因组中的单拷贝基因;室温存放一个月,无明显活性改变。

使用方法:

以下举例为常规PCR反应体系和反应条件，实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

1. PCR反应体系:

试 剂	50 μ l体系	终浓度
10 \times <i>Pfu</i> PCR Buffer	5 μ l	1 \times
dNTP Mix, 10 mM each	1 μ l	200 μ M each
Forward Primer (10 μ M)	1-2 μ l	0.2-0.4 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	1-2 μ l	0.2-0.4 μ M
Template DNA	<1 μ g	<1 μ g/reaction
<i>Pfu</i> DNA Polymerase, 2.5 U/ μ l	1 μ l	
RNase-Free Water	up to 50 μ l	

注意:

1) 用*Pfu*酶扩增时，引物的纯度要求较高，引物长度大于18个碱基，引物浓度请以终浓度 0.2-0.4 μ M作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。

2) 镁离子浓度请以终浓度1.5-3 mM作为设定范围的参考。本产品的10 \times *Pfu* PCR Buffer中已经含有20 mM镁离子，可根据不同的引物对和模板来调节镁离子浓度，由此优化反应体系。

2. PCR反应条件

步骤	温度	时间
预变性	94 $^{\circ}$ C	2min
变性	94 $^{\circ}$ C	30S
退火	55 $^{\circ}$ C-65 $^{\circ}$ C	30S
延伸	72 $^{\circ}$ C	60S *
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5min

} 25-35
循环

* 延伸时间可以根据产物大小调整，*Pfu* DNA Polymerase扩增速度为1kb/min

注意:

- 1) *Pfu*酶的热稳定性比Taq酶好, 对于GC含量很高的模板, 变性温度可以提高到98℃, 对*Pfu*酶的活性无影响。
 - 2) 一般实验中退火温度比扩增引物的熔解温度 T_m 低2℃, 无法得到理想的扩增效率时, 适当降低退火温度; 发生非特异性反应时, 提高退火温度, 由此优化反应条件。
 - 3) *Pfu*酶具有3' -5' 外切酶活性, 所以*Pfu*酶扩增时延伸速度远比Taq酶低, 延伸时间根据所扩增片段大小设定, 本产品的扩增延伸速率为1 kb/1 min, 根据目的片段大小可以适当更改延伸时间。
 - 4) 可根据扩增产物的下游应用设定循环数。如果循环次数太少, 扩增量不足; 如果循环次数太多, 错配机率会增加, 非特异性背景严重。所以在保证产物得率的前提下应尽量减少循环次数。
 - 5) 本产品具有3' -5' 外切核酸酶活性, PCR产物3' 端不带“A”, 不能直接用于T/A克隆, 如需进行T/A克隆则需要在其末端添加“A”或用平末端载体进行克隆。
3. 结果检测: 反应结束后取5 μ l反应产物, 加入适量上样缓冲液后, 进行琼脂糖凝胶电泳检测。