

Pfu DNA Polymerase

目录号: E002

01/ 产品描述

本制品为 *Pyrococcus furiosus* 中分离的 pfu DNA 聚合酶基因在大肠杆菌中进行表达后经多步纯化分离而得。Pfu DNA 聚合酶具有 3'→5'外切酶(校正)活性, 当聚合反应发生碱基错配时, 聚合酶的校正活性可将错配的碱基切除。Pfu DNA 聚合酶为使用范围最广的高保真 DNA 聚合酶, 其错误率仅为 1.3×10^{-6} , 推荐 Pfu DNA 聚合酶用于需高保真的 PCR 反应。

02/ 产品用途

用于要求保真度比较高的 PCR 反应, 包括克隆 PCR、DNA 片段拼接、引入突变、全基因合成, DNA 片段的补平等。

03/ 活性定义

在 74°C 条件下, 30 分钟内催化 10nmol dNTPs 的掺入反应成为酸不溶性物质所需的酶量为一个单位。

04/ 质量控制

经多次柱纯化, SDS-PAGE 检测纯度大于 95%, qPCR 方法检测无大肠杆菌 DNA 残留, 无核酸内、外切酶污染。

05/ 保存温度

-20°C。

06/ 产品包装

产品组成	E002-01A	E002-01B	E002-02A	E002-02B
Pfu DNA Polymerase (5U/μl)	50μl	50μl×5	50μl	50μl×5
10×Pfu Buffer with Mg ²⁺	1ml	1ml×5	1ml	1ml×5
dNTPs (10mM each)	200μl	200μl×5	-	-

07/ 使用建议

- Pfu DNA 聚合酶产生的 PCR 产物为平滑末端, 无 3'端"A"突出, 其 PCR 产物的克隆有几种方案:
 - PCR 前引物进行 5'端加磷修饰或将 PCR 产物磷酸化处理后再直接克隆于平末端的载体中;
 - 将产物 3'末端加 A 后再与 T 载体连接;
 - 引物中引入 15bp 与载体同源序列, 利 NovoRec® PCR 产物一步定向无缝克隆试剂盒 (Cat No: NR005) 直接连接到目的载体。
- 由于 Pfu DNA 聚合酶的校对活性可引起引物从 3'端被部分降解。因此在设计引物时应适当增加引物的长度, 理想的引物长度为 20-30bp。另外为了减少由 3'→5'外切酶活性引起的引物降解, 尽量在冰上配制反应体系, 并最后加入 Pfu DNA 聚合酶。

08/ 注意事项

- 2mM Mg²⁺可以满足绝大多数 PCR 扩增, 对于某些 PCR, 为了保证较好的扩增, 可调节为 2-4mM。
- 体系中加入推荐的酶量, 可以满足大多数 PCR 扩增, 对于某些 PCR, 为了得到较好的扩增, 可适当增加酶量。

09/ 操作说明

1) 常用反应体系（50μl）：

10×Pfu Buffer with Mg ²⁺ *	5μl
上游引物	0.2-1.0μM（终浓度）
下游引物	0.2-1.0μM（终浓度）
dNTPs (10mM each)	1μl
模板	1-50ng（质粒） 10ng-1μg（基因组）
Pfu DNA Polymerase (5U/μl)	0.25μl (1.25U)
ddH ₂ O	至 50μl

*Mg²⁺终浓度为 1.5mM

2) 常用 PCR 反应程序：

当扩增片段<3K：

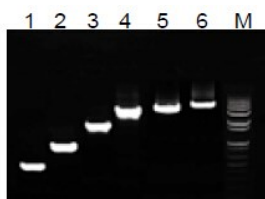
反应阶段	温度	时间	循环数
预变性	94°C	90s	1
变性	94°C	20s	30
退火	50-60°C	20s	
延伸	72°C	1kb/60s	
终延伸	72°C	5min	1
保温	4°C	保温	1

当扩增片段≥3K（推荐引物长度≥30bp）：

反应阶段	温度	时间	循环数
预变性	94°C	20s	1
变性	94°C	5s	30
退火/延伸	68°C	1kb/60s	
终延伸	72°C	5min	1
保温	4°C	保温	1

10/ 应用实例

图例一）50μl 扩增体系中，以 5ng λDNA 为模板，对 500bp~6.0kb 片段的扩增结果。



泳道 1：0.5kb；泳道 2：1.0kb；
泳道 3：2.0kb；泳道 4：3.0kb；
泳道 5：4.0kb；泳道 6：6.0kb；
泳道 M：1kb DNA Ladder Plus II。

11/ 相关产品

目录号	产品名称	目录号	产品名称
E035	2×Fast Pfu Master Mix	E031	Fast Pfu DNA Polymerase
E006	2×Pfu Master Mix	E003	KOF High-Fidelity DNA Polymerase