

2×Pfu Master Mix

目录号: E006-01

01/ 产品描述

本制品是将 PCR 反应所需的 Pfu 酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液以及优化剂和稳定剂，预先配制成 2 倍浓度的混合物。2×Pfu Master Mix 专为扩增克隆 DNA 片段优化，高保真，错误率仅为 1.3×10^{-6} 。使用时只需要加入模板和引物并稀释到 1 倍浓度即可进行 PCR 反应，非常方便。

02/ 产品特点

- 1) 高保真: Pfu DNA 聚合酶是使用最广泛的高保真酶，其保真度为普通 Taq 酶的 10 倍。
- 2) 灵敏: 可从 0.05ng 人基因组 DNA 模板中扩增出特定基因片段（图例一）。
- 3) 快捷: PCR 反应所必需试剂全集于一管之中，数分钟即可完成反应体系配制。

03/ 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、全基因合成等。

04/ 质量控制

经检测无外源核酸酶残留，qPCR 方法检测无大肠杆菌 DNA 残留，能有效扩增人基因组中的单拷贝基因。

05/ 保存温度

-20℃。

06/ 产品包装

产品组成	E006-01A	E006-01B
2×Pfu Master Mix	1ml	1ml×5

07/ 使用建议

Pfu DNA 聚合酶产生的 PCR 产物为平末端，无 3'端"A"突出，除使用 NovoRec® PCR 一步定向克隆试剂盒 (Cat. No: NR005) 外，其它 PCR 产物的克隆方案有：

- 1) 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。
- 2) 将产物 3'末端加 A 后再与 T 载体连接。
- 3) 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 20~30mers。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。

08/ 注意事项

- 1) 需要溶解完全后使用，防止离子浓度不均匀。
- 2) 应根据实验目的选择合适的循环数，循环数过少，会造成扩增量不足。循环数过多，扩增量增加，但突变率会增加，并造成非特异性扩增。
- 3) 根据引物 T_m 值设置合适的退火温度，退火温度过低，会造成非特性扩增。退火温度过高，可能扩增不到目的条带。

09/ 操作说明

1) 常用反应体系（50μl）：

2×Pfu Master Mix*	25μl
上游引物	0.2-1.0μM（终浓度）
下游引物	0.2-1.0μM（终浓度）
模板	1-50ng（质粒） 10ng-1μg（基因组）
ddH ₂ O	至 50μl

*Mg²⁺终浓度为 2mM

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

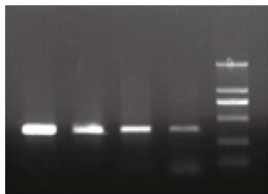
当扩增片段≥3K（推荐引物长度≥30bp）：

反应阶段	温度	时间	循环数
预变性	94°C	5min	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，分别以 50ng~0.05ng 人基因组 DNA 模板，对特定基因片段进行扩增。

1 2 3 4 M 泳道 1：50ng；泳道 2：5ng；
泳道 3：0.5ng；泳道 4：0.05ng；
泳道 M：DNA Ladder 2000。



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
E002	Pfu DNA Polymerase	E003	KOF High-Fidelity DNA Polymerase