

Fast Pfu DNA Polymerase

目录号: E031

01/ 产品描述

本制品是通过采用分子进化技术对普通 Pfu 酶进行改造而获得的新型 Fast Pfu 酶，是新一代的高保真 DNA 聚合酶。该酶解决了高保真 PCR 反应中 Pfu 酶扩增灵敏度低、延伸速度缓慢的难题，能够高效、快速扩增≤6kb 片段目的基因片段（最长可达 20kb），模板低至 0.05ng，并且在 DNA 末端补平、全基因合成、引入突变等之中有着很好的应用。

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末端补平等，也用于复杂模板，高GC/AT模板的扩增。

03/ 产品特点

- 1) 高保真：保真度高于Pfu酶，为普通Taq酶的50倍。
- 2) 快速高效：Fast Pfu扩增速度为普通Pfu酶的数倍，72°C保温30秒可延伸1kb以上。扩增长度可达20kb，能高效扩增≤6kb片段。
- 3) 高灵敏：可从0.05ng人基因组DNA模板中扩增出1.2kb特定基因片段，扩增性能显著优于普通Pfu酶。
- 4) 独特配方的 5×Buffer：使 PCR 扩增反应更加稳定、灵敏、高效。

04/ 质量控制

经多次柱纯化，SDS-PAGE胶检测仪可见清晰单一的目的条带，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	E031-01A	E031-01B	E031-02A	E031-02B	E031-02-M001
Fast Pfu DNA Polymerase (5U/μl)	50μl	50μl×5	50μl	50μl×5	1ml
dNTPs (10mM each)	200μl	200μl×5	-	-	
5×Fast Pfu Buffer with Mg ²⁺	1ml×2	(1ml×2)×5	1ml×2	(1ml×2)×5	10ml×4

07/ 活性定义

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

08/ 使用建议：

Fast 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 Fast 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，并最后加入 Fast Pfu DNA 聚合酶。

09/ 操作说明

1. 常用反应体系 (50 μ l)

5 \times Fast Pfu Buffer with Mg ²⁺ *	10 μ l
上游引物	0.2-1.0 μ M (终浓度)
下游引物	0.2-1.0 μ M (终浓度)
dNTPs(各 10mM)	1 μ l
模板	1-50ng (质粒) 10ng-1 μ g (基因组)
Fast Pfu DNA 聚合酶	0.25 μ l(1.25U)
ddH ₂ O	至 50 μ l

* Mg²⁺终浓度为 2mM

2. 常用 PCR 循环

循环数	温度	时间
1	94 $^{\circ}$ C	90s
30	94 $^{\circ}$ C	20s
	50-60 $^{\circ}$ C	20s
	72 $^{\circ}$ C	1kb/30s
1	72 $^{\circ}$ C	5min
1	4 $^{\circ}$ C	保温

10/ 应用实例

图例一) 50 μ l 扩增体系中, λ DNA 为模板, 扩增 1kb~20kb 片段。

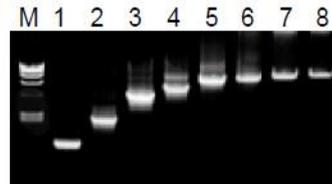
泳道 M: λ /Hind III DNA Marker;

泳道 1: 1kb; 泳道 2: 2kb;

泳道 3: 4kb; 泳道 4: 6kb;

泳道 5: 8kb; 泳道 6: 10kb;

泳道 7: 12kb; 泳道 8: 20kb。



11/ 注意事项

- 1) 对高GC含量模板, 建议将变性温度提高到98 $^{\circ}$ C。
- 2) 对于高GC模板, 建议配套使用PCR增强剂III (Cat. No: E055), 或者添加终浓度为5%-8% DMSO。

12/相关产品

目录号	产品名称	目录号	产品名称
E035-01	2 \times Fast Pfu Master Mix	E035-02	2 \times Fast Pfu Master Mix (Quick Load)
E002-01	Pfu DNA Polymerase (with dNTP)	E002-02	Pfu DNA Polymerase
E006-01	2 \times Pfu Master Mix	E006-02	2 \times Pfu Master Mix (Quick Load)