

## Pfu Kit

货号: P3022

### 产品简介

Pfu Kit 是 2×浓缩的 PCR 扩增预混和溶液, 含有 Pfu DNA 聚合酶、dNTP 混合物、缓冲液等 PCR 扩增必需组分 (模板与引物除外)。使用时, 仅需将反应缓冲液与 Pfu DNA 聚合酶按照比例混合后, 在扩增体系中加入模板和引物即可进行 PCR, 大大简化操作过程, 缩短操作时间, 降低污染 (加样次数减少)。同时, 由于体系内含有优化剂与增强剂, 能够显著增强 PCR 扩增的灵敏度。

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 2 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	P3022
2× Pfu Reaction Mix	1 ml×5
Pfu DNA 聚合酶 (5U/μl)	160 μl

本产品分含体系中包含溴酚蓝、不含溴酚蓝两类。体系中包含溴酚蓝的产品, PCR 扩增产物可直接电泳检测。这两类产品的扩增性能无差异。如没特别说明提供体系中包含溴酚蓝的包装。

### 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	2× Pfu Reaction Mix	25 μl	1×
2	upstream primer (10 μM) <sup>[1]</sup>	2 μl	0.4 μM
3	downstream primer (10 μM) <sup>[1]</sup>	2 μl	0.4 μM
4	Pfu DNA 聚合酶 (5U/μl) <sup>[2]</sup>	0.5-1 μl	2.5U-5U
5	template DNA <sup>[3]</sup>	1-4 μl	<1μg
6	超纯水 <sup>[4]</sup>	To 50 μl	-
optional	MgCl <sub>2</sub> (MgSO <sub>4</sub> )/PCR Enhancer <sup>[5]</sup>	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 MgCl<sub>2</sub> (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 <sup>[1]</sup>	30 sec	
Extension	72°C	Variable <sup>[2]</sup>	

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

反应产物可直接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）、MgCl<sub>2</sub>（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 <sup>2+</sup> 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<sup>-6</sup>。

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。