

## Pfu DNA Polymerase

### 货号规格

货号	P1021	P1022*	P1023	P1024*
规格	250U	250U	1,000U	1,000U

\* 含 dNTPs

### 产品简介

Pfu DNA Polymerase 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 5 kb（简单模板）。延伸速度为 1min/kb（70~75℃，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	P1021	P1022	P1023	P1024
Pfu DNA Polymerase (5U/μl)	50 μl	50 μl	200 μl	200 μl
10× Pfu Buffer (Mg <sup>2+</sup> Plus) [1]	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml × 2	1.25 ml × 2
6× Loading Buffer [2]	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
dNTPs (2.5mM) [3]	-	1 ml	-	1 ml × 2

[1] 10× Pfu Buffer 分为 Mg<sup>2+</sup> Plus 与 Mg<sup>2+</sup> Free 两种包装，可方便选择。如无特别说明提供 10× Pfu Buffer(Mg<sup>2+</sup> Plus)。Mg<sup>2+</sup> Free 的 10×Pfu Buffer 提供 25 mM MgCl<sub>2</sub>。

[2] 6× Loading Buffer，如有需要可单独购买（Cat. #: M9041）。

[3] dNTPs 是 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 等摩尔混合物，P1021/P1023 不含 dNTPs，如有需要请单独购买（Cat. #: P9011/P9012/P9013）。

### 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℃、30 min 内，摄入 10 nmol 全核苷酸所需的酶量。

### 保存条件

-20℃ 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	50-μl rxn	Final conc.
1	10× Pfu Buffer (Mg <sup>2+</sup> Plus)	5 μl	1×
2	dNTPs (2.5mM)	4 μl	0.2 mM
3	upstream primer (10 μM) [1]	2 μl	0.4 μM
4	downstream primer (10 μM) [1]	2 μl	0.4 μM
5	Pfu DNA Polymerase (5U/μl) [2]	0.5 μl-1 μl	2.5U-5U
6	template DNA [3]	1-4 μl	<1 μg
7	超纯水 [4]	To 50 μl	-
optional	MgCl <sub>2</sub> (MgSO <sub>4</sub> )/PCR Enhancer [5]	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℃	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

将产物与 loading buffer 混匀后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 Polymerase 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 Polymerase 或模板 DNA。

2 Pfu DNA Polymerase 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 Polymerase 的碱基错误率为  $1 \times 10^{-6}$ 。

4 dUTP、dITP 和含有这些核苷酸的引物不能用于 Pfu DNA Polymerase 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。