

HS *Pfu* DNA 聚合酶

目录号: AE0205/AE0206

使用前请仔细阅读说明书

产品说明

本酶为热启动 *Pfu* DNA 聚合酶，来源于大肠杆菌重组表达的 *Pyrococcus furiosus* DNA 聚合酶，分子量为 90 KD。其保真性是普通 Taq DNA 聚合酶的 18 倍左右。本酶经特殊改造，具有超强扩增能力和延伸速度，扩增片段的长度可达 5-6 kb，延伸速度为 1 kb/min (72°C)。该酶具有 5'→3' 聚合酶活性和 3'→5' 外切酶活性。扩增产物为平末端，不适合 TA 克隆。

活性定义

以大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，在 72°C、30 min 内，将 10 nmol 脱氧核糖核苷酸掺入到酸不溶物中所需的酶量，定义为一个活性单位 (U)。

浓度: 2.5U/μl

保存条件: -20°C 保存

特点

- 本酶为热启动聚合酶，可提高扩增的特异性，减少非特异性扩增和引物二聚体；
- 本酶经特殊改造，相比传统 *Pfu* DNA 聚合酶，具有加强的扩增能力和延伸速度，可在 1kb/min 延伸条件下，有效扩增 5-6kb 的 DNA 片段；
- 热稳定性好：98°C 下半衰期超过 60 min；
- 保真性最高：保真性是 Taq DNA 聚合酶的 10 倍；
- 不耐受 dUTP、dITP；
- PCR 产物具有平滑末端，可直接用于平端克隆。

适用范围

- 高保真性 PCR 扩增
- 制备基因克隆或蛋白表达用的 PCR 产物
- 平末端 PCR 克隆(去除 3'突出端)
- 位点特异性突变

产品包装规格及组成

Component	AE0205A/ AE0206A*	AE0205B/ AE0206B*	AE0205C/ AE0206C*	AE0205D/ AE0206D*
HS <i>Pfu</i> DNA polymerase	100U	500U×5	500U×4	1000U×5
10× <i>Pfu</i> Buffer	0.5 ml×1	0.5 ml×5	1.0 ml×10	1.0 ml×25
2 mM dNTPs	-/0.5 ml×1	-/0.5 ml×5	-/1.0 ml×10	-/1.0 ml×25

*附带 2mM dNTP 混合物。

质量控制

相关测试表明无外源内切酶或外切脱氧核糖核酸酶、核糖核酸酶污染。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。

室温放置一周，扩增活性无明显改变；但强烈建议不要在室温下长期放置，用毕放回 -20 度。

酶贮存缓冲液

20 mM Tris-HCl (pH 8.2), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.1% Nonidet P40, 0.1% Tween 20, and 50% glycerol.

应用举例

注：以下反应举例为 50 μ l 标准 PCR 体系，仅供参考。实际 PCR 条件应根据模板、引物、目的片段大小加以优化，确定最佳反应条件。

组份	体积/ μ l	终浓度
10 $\times$ Pfu Buffer	5	1 $\times$
dNTPs (2.0 mM)	5	0.2 mM
引物 F (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
引物 R (10 μ M)	1.5	0.3 μ M
Template	Variable*	/
HS Pfu (2.5U/ μ l)	1.0	2.5U
ddH ₂ O	Variable	/
总体积	50	/

*DNA template 可参照如下标准 (50 μ l PCR 体系)：

- 人类基因组 DNA 0.1 μ g-1 μ g
- λ DNA 0.5 ng-5 ng
- 质粒 DNA 0.01 ng-1 ng
- 大肠杆菌 DNA 10 ng-100 ng

PCR 反应条件

95 $^{\circ}$ C	5min	} 30 Cycles
95 $^{\circ}$ C	15sec	
55~72 $^{\circ}$ C	20 sec	
72 $^{\circ}$ C	1kb/min	
72 $^{\circ}$ C	5 min	

注意事项

- 本酶为热启动聚合酶，需 95 度加热 5 分钟或 98 度加热 2 分钟而激活；因此有利于提高扩增的特异性，减少非特异性扩增和引物二聚体，得到良好的 PCR 结果。
- Pfu DNA 聚合酶具有很强的 3' 外切核酸酶活性，因此在 PCR 产物 3' 为平末端，不适合 TA 克隆。要进行 TA 克隆需用 Taq DNA 聚合酶对 PCR 产物进行加 A 处理。
- Pfu DNA 聚合酶为高保真酶，忠实性是 Taq DNA 聚合酶的 18 倍。
- 建议在冰上配置 PCR 反应液后，再放入 PCR 仪中进行扩增。这有利于提高扩增的特异性，减少非特异性扩增，得到良好的 PCR 结果。
- 如进行 PCR 扩增后，除目的条带外，还伴随其他杂带，建议适当减少体系中的酶用量，以增加 PCR 扩增反应的特异性。
- 本公司 Buffer 经大量 PCR 反应实例优化而成，然而对某些 PCR 反应存在一个最优的镁离子浓度。若需要优化镁离子浓度，请购买本公司不含镁离子的 buffer 和 MgCl₂/MgSO₄。
- 因该酶与含有尿嘧啶和次黄嘌呤的 DNA 模板结合后会抑制 DNA 聚合反应，故 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。

警告：本产品仅限科研实验使用，临床应用安全性和有效性未鉴定，不可用于医疗临床诊断。