

Pfu Fast DNA polymerase

产品简介

Pfu DNA 聚合酶是常用的高保真 DNA 聚合酶，其保真度是 Taq DNA 聚合酶的 10 倍以上。Pfu Fast DNA 聚合酶是由海狸团队采用分子生物学手段对普通 Pfu DNA 聚合酶进行改造获得的新型高保真 DNA 聚合酶，具有快速(~2 kb/min)、高灵敏度、高保真度、抗干扰能力强等特点。本产品适用于保真度比较高的 PCR 反应，包括克隆 PCR、DNA 片段拼接、引入突变、全基因合成等。

产品组成

| 编号 | 试剂盒组成 | 80105S (250U) | 80105L (1000U) | 储存条件 | 保质期 |
|----|--|------------------|-------------------|-------|-----|
| ① | Pfu Fast DNA polymerase (2.5U/μL) | 100μL | 400μL | -20°C | 2 年 |
| ② | 10×Pfu PCR Buffer (含 20mM Mg ²⁺) | 0.6mL | 2.5mL | | |
| ④ | 5×GC Buffer I | 1mL | 4mL | | |
| ⑤ | 5×GC Buffer II | 1mL | 4mL | | |

单位定义

72°C 条件下，30 分钟内将 10nmol 脱氧核糖核苷酸(dNTPs)合成多聚核苷酸所需的酶量定义为 1 个活性单位。

纯度

无外源核酸酶污染，qPCR 检测无外源 DNA，SDS-PAGE 检测纯度 >95%。

操作说明

1. PCR 各组份在冰上完全融化并充分混匀，最后加入 Pfu Fast DNA polymerase 聚合酶，以减少引物二聚体和非特异性条带的产生（加样操作均在冰上完成）。以 50μL 反应体系为例，按照下表进行加样。

| 组分 | 加入体积 | 终浓度 |
|--|------------|---------------|
| 10×Pfu PCR Buffer (含 Mg ²⁺) ^a | 5μL | 1×PCR Buffer |
| 2.5mM dNTP | 5μL | 0.25mM |
| 50mM MgCl ₂ ^b | Variable | 1~2mM |
| Primer F (10μM) | Variable | 0.2~0.4μM |
| Primer R (10μM) | Variable | 0.2~0.4μM |
| Template DNA ^c | Variable | 10pg~1μg/50μL |
| Pfu Fast DNA polymerase (2.5U/μL) ^d | 1μL | 2.5units |
| ddH ₂ O | Up to 50μL | |

a. 扩增高 GC 含量模板，复杂模板时可额外添加 GC Buffer I 或 II。

b. Pfu Fast DNA polymerase 的催化活性对 Mg²⁺ 浓度非常敏感，Mg²⁺ 浓度在 1.0-6.0mM 之间该酶均有活性。镁离子最佳浓度的确定依赖于 dNTP 的浓度、特定的 DNA 模板和样品缓冲液组分，因此需要根据反应体系情况优化并调节镁离子浓度（标准 PCR 反应镁离子最佳浓度比 dNTP 浓度高约 0.5mM-1.0mM）。

c. 不同类型的 DNA 模板，在 50μL 反应体系中的推荐用量为：哺乳动物基因组 DNA：0.1-1μg；大肠杆菌基因组 DNA：10-100ng；质粒 DNA：0.1-10ng。

d. Pfu Fast DNA polymerase 具有较强的 3'-5' 外切酶活性，在无 dNTP 时可以降解引物，该酶需要在冰上操作且最后加入，加入该酶后应立即进行 PCR，在扩增长片段时可适当提高酶的用量。

2. 优化参数如下：

| 参数 | 目的基因 ≤10kb | 目的基因 ≥10kb | cDNA |
|-----|--|--------------------------------|------|
| | 模板 | 100ng 基因组 DNA 5-30ng 质粒 DNA | |
| 硫酸镁 | 目的基因 >5kb，加入 50mM 硫酸镁 (1-2μL) 至终浓度 3-4mM | | |

PCR 循环

| 循环数 | 温度 | 延伸时间 (质粒或基因组 DNA) | 延伸时间 (cDNA) |
|---|--------|--------------------------|--------------------|
| 1 | 95°C | 2min | 1min |
| 30-35cycles (质粒或基 因组 DNA) 40cycles (cDNA) | 95°C | 20s | 20s |
| | Tm-5°C | 20s | 20s |
| | 72°C | 15s (目的基因 ≤1kb) | 30s (目的基因 1kb) |
| | | 2-4kb/min(目的基 因 >1kb) | 2kb/min(目的基因 >1kb) |
| 1cycles | 72°C | 5min | 5min |

3. 实验结果

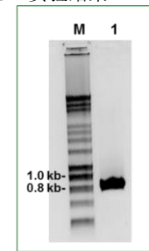


Fig. 837 bp 大小的目标 DNA 片段扩增结果

注意事项：

1. 请将需要预混的全部组分配制成 PCR 混合物后使用，以降低加样误差。
2. 使用的 PCR 仪如无加热盖，推荐在 PCR 样品上方覆盖少量矿物油。
3. PCR 各组份在冰上融化并充分混匀后，最后加入 Pfu Fast DNA 聚合酶，以减少引物二聚体和非特异性条带产生，所有操作均在冰上完成。
4. 若待扩增的 DNA 片段具有高 GC 含量，可在上述反应体系基础上加入相应的 5×GC Buffer I 或 5×GC Buffer II，使两者终浓度为 1×，以改善高 GC 含量片段的扩增。

产品列表

| 货号 | 产品名称 | 规格 |
|--------|-------------------------|-------|
| 80105S | Pfu Fast DNA polymerase | 250U |
| 80105L | Pfu Fast DNA polymerase | 1000U |

有限使用商标许可

海狸纳米科技(苏州)有限公司声明对其开发的或者与其他单位合作开发的所有内容和服务拥有或者与合作者共同拥有全部知识产权，受有关商标权、专利、版权等知识产权法律的保护。本产品的购买者享有的权利仅限于对所购买数量的本产品进行内部研究使用，并且该权利不可转让，亦不可用于任何商业应用，购买者无权对该产品或其任何一部分进行重新销售。如出于商业用途的使用（包括但不限于代理销售），则必须经过海狸纳米科技(苏州)有限公司的书面许可，并在使用时注明来源和知识产权、版权等系海狸纳米科技(苏州)有限公司所有的标记。如需获得其它权限信息，请联系 Beaver@beavernano.com，或者海狸纳米科技(苏州)有限公司地址：苏州工业园区星湖街 218 号生物科技园 A6-101，邮编 215123。

本产品由海狸纳米科技(苏州)有限公司生产。

版权声明：

©2013 海狸纳米科技(苏州)有限公司保留所有权利。本《用户手册》所呈现的任何内容，无论商标、设计、文字、图像和任何其他信息，未经特殊说明，其著作权均归属海狸纳米科技(苏州)有限公司所有。对于违反国家有关法律法规，不尊重本声明，不经同意，擅自使用本《用户手册》内容并不注明出处的行为，本公司保留采取法律措施，追究其责任的权力。

需要支持，请访问：www.beavernano.com/support 或电子邮件：Service@beavernano.com