



版本号: EP121221

Pfu DNA Polymerase

目 录 号: EP101

储存条件: -20℃ 保存

浓 度: 2.5 U/μl

产品内容:

产品组成	EP101-01	EP101-02
Pfu DNA Polymerase	250 U	500 U
10× Pfu Buffer	1.8 ml	1.8 ml

Order: 010-59822688

Toll-free: 800-990-6057/400-810-6057

TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD.

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品简介

Pfu DNA Polymerase是从克隆有Pyrococcus furiosus DNA Polymerase基因的大肠杆菌中分离纯化的，Pfu DNA Polymerase具有5'-3'DNA聚合酶活性和3'-5'的外切酶活性，能纠正DNA扩增过程中产生的碱基错配。Pfu酶是目前已发现的所有耐高温DNA Polymerase中出错率最低的。其PCR产物为平端，可加A处理再与T载体连接或使用平末端克隆载体。

活性单位

1单位（U）Pfu DNA Polymerase活力定义为在74℃、30 min内，以活性化的大马哈鱼精子DNA作为模板/引物，将10 nmol脱氧核苷酸掺入到酸不溶物质所需的酶量。

质量控制

SDS-PAGE检测纯度大于99%；经检测无外源核酸酶活性；能有效地扩增人基因组中的单拷贝基因；室温存放一周，无明显活性改变。

酶储存缓冲液

50 mM Tris-HCl (pH 8.2); 0.1 mM EDTA;
1 mM DTT; Stabilizers; 50% Glycerol。

10× Pfu Buffer

200 mM Tris-HCl (pH 8.8); 100 mM KCl; 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 20 mM MgSO_4 ; 其它成分。

10× Pfu Buffer分为含 Mg^{2+} 和不含 Mg^{2+} 两种，可自选。
不含 Mg^{2+} 的Buffer另外配有25 mM Mg^{2+} 。

如果没有特别指定，通常提供的为含有 Mg^{2+} 的Buffer。

适用范围

用于DNA的高保真扩增，如基因表达克隆、基因定点突变、细胞内基因点突变的分析（SNP）和末端补平等。

注意事项

Pfu酶具有3'-5'的外切酶活性，所以Pfu酶扩增时延伸速度远比Taq酶低，应根据扩增产物的长度设置相应的延伸时间，一般情况下Pfu酶的延伸速度为每分钟 0.5-1 Kb；同时Pfu酶的3'-5'的外切酶活性可能降解引物，所以应先加dNTPs后，再加Pfu酶到反应体系中，并立即进行PCR反应。

用Pfu酶扩增时，引物的纯度要求较高，引物长度大于18个碱基， T_m 在55-80°C之间，引物浓度在0.1-0.5 μM 之间，比Taq酶略高。

Pfu酶的热稳定性比Taq酶好，对于GC含量很高的模板，变性温度可以提高到98°C，对Pfu酶的活性无影响。

扩增片段大小

注意：以下举例为常规PCR反应系统，仅供参考。实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异，需根据模板、目的片段的大小、碱基序列和引物长短等具体情况，设定最佳反应条件。

以人基因组DNA为模板，扩增1 kb的片段

1. PCR反应体系的建立，50 μl 体系如下(可根据比例放大或缩小体系):

组成成份	体积
Template	<1 μg
Primer 1 (10 μM)	1 μl
Primer 2 (10 μM)	1 μl
10 \times Pfu Buffer	5 μl
dNTP Mixture(2.5 mM)	4 μl
Pfu (2.5 U/ μl)	0.5-1 μl
ddH ₂ O	补至50 μl

2. PCR反应循环的设置:

94°C 3 min

94°C 30 sec

55°C 30 sec

72°C 2 min

72°C 5 min

} 30 cycles

3. 结果检测：反应结束后取5 μl 反应产物，琼脂糖凝胶电泳检测。