

Pfu DNA Polymerase

Pfu DNA 聚合酶

目 录 号: EP101

储存条件: -30~-15℃ 保存2年

浓 度: 2.5 U/μl

产品内容:

产品组成	EP101-02
Pfu DNA Polymerase	500 U
10× Pfu Buffer	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中出错率很低的。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检测纯度达标; 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(15-30℃)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 (NH₄)₂SO₄; 20 mM MgSO₄; 其它成分。

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℃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℃, 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, 设定优化反应条件。

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):

组成成分	体积
Template	<1 μg
Primer 1 (10 μM)	1 μl
Primer 2 (10 μM)	1 μl
10×Pfu Buffer	5 μl
dNTP Mixture(2.5 mM)	4 μl
Pfu DNA Polymerase(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℃ 3 min

94℃ 30 sec

55℃ 30 sec

72℃ 2 min

72℃ 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。