

## Pfu DNA Polymerase

### 包装量:

目录编号	包装单位
150301	250U
150302	500U
150303	3000U

组成	150301	150302	150303
Pfu DNA Polymerase	250U	500U	3000U
10×Pfu Buffer <sup>+</sup> (with MgSO <sub>4</sub> )	1ml	1ml	6×1ml
SuperPure dNTP mix (10 mM Each)	0.1ml	0.2ml	1.2ml

储存: -20 °C 保存。浓度: 5U/μl

**制品说明:** 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' 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, 可直接用平端载体克隆。

**活性单位:** 1 单位 (U) Pfu DNA Polymerase 活力定义为在 74°C、30 分钟内, 以活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板引物, 将 10nmol 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; PCR 方法检测无宿主残余 DNA, 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。

**酶贮存缓冲液:** 50mM Tris-HCl (pH 8.2), 0.1mM EDTA, 1mM DTT, Stabilizers, 50% glycerol。

**10×Pfu Buffer (含 Mg<sup>2+</sup>):** 200 mM Tris-HCl (pH8.8), 100 mM KCl, 100 mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 其他成分。

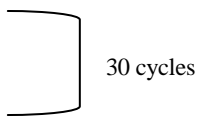
**适用范围:** 用于 DNA 的高保真扩增, 如基因表达克隆、基因定点突变、细胞内基因点突变分析 (SNP) 和平末端补平等。

- 注意事项:**
- (1) Pfu 酶具有 3' -5' 的外切酶活性, 所以 Pfu 酶扩增时延伸速度比 *Taq* 酶低, 应根据扩增产物的长度设置相应的延伸时间, 建议 Pfu 酶的延伸速度为每分钟 1 kb 如扩增片段小于 4 kb; 延伸速度为每分钟 0.5 kb 如扩增片段大于 4 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 dNTP 后, 再加 Pfu 酶到反应体系中, 并立即进行 PCR 反应。
  - (2) 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, Tm 在 55-80°C 之间, 引物浓度在 0.1-0.5 μM 之间, 比 *Taq* 酶略高。
  - (3) 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。
  - (4) 高保真 Pfu 对于 dNTP 纯度要求很高, 因此建议用本酶配套的超纯 dNTP mix。

建议的 PCR 条件: (以 50 $\mu$ l 反应体系为例)

Template	<0.5 $\mu$ g
Forward Primer(10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Reverse Primer(10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
10 $\times$ Buffer(With $MgSO_4$ )	5 $\mu$ l
SuperPure dNTP Mixture(各 10mM)	1 $\mu$ l
Pfu DNA polymerase(5U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ l

PCR 反应循环的设置:

94°C:	2-5 min	
94°C:	30 sec	
50-60°C:	30 sec	
72°C:	2 min/1 kb	
72°C:	5-10 min	