



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ 高保真PCR扩增试剂盒
 - ◆ 目录号 1521
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

高保真 PCR 扩增试剂盒

目录号：1521

目录编号	包装单位
152101	100次
152102	500次

❖ 产品组成、储存：

组成	100次	500次
Pfu (5 U/ μ l)	50 μ l	250 μ l
10 \times Pfu Buffer (Mg ²⁺ Plus)	1 ml	3ml
dNTP (10mM each)	100 μ l	0.5 ml
PCR 灭菌水	5 ml	25 ml

储存：-20 °C

❖ 产品介绍：

本试剂盒提供 DNA 高保真扩增所需要的基本试剂。DNA 扩增时，用户需要自行准备模板和扩增所需要的引物。高温嗜热 Pfu DNA 聚合酶主要用于对保真度要求非常高的 DNA 扩增，这些扩增要求扩增的产物中不能出现突变等错误。Taq DNA 聚合酶的扩增性能很强，但是用 Taq 扩增的 PCR 产物中有难以避免的随机突变。Pfu DNA 聚合酶除了 5'-3'的聚合特性外，还有 3'-5'端外切酶活性，具有校正 DNA 扩增过程中突变。

Pfu DNA 的长片段扩增的能力不及 Taq DNA 聚合酶，客户如果用于长链 PCR 扩增，可选用本公司的 Long Taq 或者 Taq Plus DNA 聚合酶。

❖ **举例说明：**

按下列组份配制 PCR 反应液

Pfu (5 U/μl)	0.5 μl
10 ×Pfu PCR Buffer (Mg ²⁺ Plus)	5 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μl
模板DNA (质粒5-20ng, 基因组100-500 ng)	? μl
引物 1 (20 μM)	1 μl
引物 2 (20 μM)	1 μl
灭菌蒸馏水	up to 50 μl

混匀后，按下表的条件立即进行 PCR

循环次数	反应阶段	温度	时间
1	变性	92-94 °C	2 分钟
	变性	92-94 °C	30秒
20-35	退火	55 °C	45秒
	延伸	72 °C	2分钟/kb
1	延伸	72 °C	7分钟



❖ **注意事项:**

1. Pfu 扩增效率通常比 Taq 酶差, 这是由于 Pfu 具有 3'-5' 的外切酶活性 (高保真性) 所引起的, 不是由于 Pfu 酶的质量不稳定所致。Pfu 扩增 1.5kb 以下的 DNA 片段和 Taq 没有多大差别。
2. 10×Pfu PCR Buffer 中已含有 Mg^{2+} , 用该缓冲液能保证扩增产物的保真性。提高反应体系的 pH 和 Mg^{2+} 浓度能部分提高 DNA 扩增的产率, 但产物的保真性将有所下降。
3. 用 Pfu 扩增时, 引物的纯度要求较高, 长度要求大于 18bp, T_m 在 55-80℃ 之间。引物的浓度在 0.1-0.5 μ M 之间, 比 Taq 略高。Pfu 具有 3'-5' 的外切酶活性可能会降解引物, 特别是溶液中没有 dNTP 的情况下。所以, Pfu 必须是最后加入到反应体系中, 并立即进行 PCR 反应。
4. Pfu 的热稳定性比 Taq 酶高, 对于 GC 含量很高的模板, 变性温度可以提高到 98℃, 而不会影响 Pfu 的活性。
5. PCR 产物为平端, 不能直接用 T/A 克隆方式克隆。需要加 A 后才能进行克隆。

