

### 产品名称 & 产品编号

产品名称: *Pfu* DNA Polymerase

产品编号: P004

### 简介

*Pfu* DNA 聚合酶为大肠杆菌重组产品, 能部分纠正 DNA 扩增过程中产生的错误, *Pfu* 的超常纠错特性是由该酶本身的性质决定的, 反应条件如  $Mg^{2+}$ , dNTP 浓度, 扩增的循环次数, 模板量, 酶添加量都会影响 PCR 扩增产物的正确率。其它高温 DNA 聚合酶与 *Pfu* 混合使用, 可以部分提高扩增效率, 降低产品的扩增。在基因克隆、表达和基因突变分析等分子生物操作, 对 DNA 扩增产物的正确率要求特高, 选择 *Pfu* DNA 聚合酶是比较理想的选择。

### 活性定义

1 单位 *Pfu* 定义为在 72° C 30 分钟内将 10nmol 同位素标记的 4X dNTP 掺入到 DE81 纸不溶物质中所需酶量。

### 10 X PCR 反应缓冲液

100mM KCl, 160mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 20mM  $MgSO_4$ , 200mM Tris-HCl, pH8.8, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA

### 质量控制

经检测无外源核酸酶活性; SDS-PAGE 检测纯度大于 95%; 能从 25ng lambda 模板中扩增出 1kb 和 2kb 的单拷贝基因。

### 储存条件

*Pfu* 成品保存于 50mM Tris-HCl, pH8.2, 0.1mM EDTA, 0.1% Tween 20, 0.1% NP-40, 1mM DTT, 50% glycerol, -20° C, 活性一年以上。

### 主要应用领域

- 常规 PCR
- 基因的高保真扩增, 克隆和表达
- 基因的定点突变

### 主要技术参数

*Pfu* DNA 聚合酶采用重组方式生产。分子量为 90KD; PCR 产物为平端, 无 3' 端的单个 dA; 有 3' -5' 外切核酸酶活性 (高保真); 无 5' -3' 外切核酸酶活性; DNA 聚合延伸速度为每分钟 600 碱基以上; 最佳温度 65-75 度; dNTP 的工作浓度为 100-300uM, 最佳  $Mg$  浓度为 2-3mM, 最佳 pH 为 8.1-9.1; -20 度保存一年以上。

### *Pfu* DNA 聚合酶的使用方法

*Pfu* DNA 聚合酶的使用方法基本同 Taq DNA 聚合酶。DNA 扩增 (PCR) 时, 50ul 标准反应体系需 2.5U 左右。

### 注意事项

- *Pfu* 扩增效率通常不及 Taq 酶, 是因为 Taq 和 *Pfu* 的特性不同, 不是因为 *Pfu* 酶的质量不稳定所致或活性丧失。
- 10×*Pfu* PCR Buffer 中已含有  $Mg^{2+}$ , 用该缓冲液能较好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。
- 用 *Pfu* 扩增时, 引物的纯度要求较高, 长度要求大于 18 base,  $T_m$  在 55-80°C 之间。引物的浓度在 0.1-0.5uM 之间, 比 Taq 略高。*Pfu* 具有

3' -5' 的外切酶活性可能會降解引物，特別是溶液中沒有dNTP的情況下。所以，Pfu必須是最后加入到反應體系中，並立即進行PCR反應。

- Pfu的熱穩定性比Taq酶高，對於GC含量很高的模板，變性溫度可以提高到 98℃,而不會影響Pfu的活性。

- PCR產物為平端，不能直接用T/A克隆方式克隆。

- 不同來源的高溫聚合酶其最佳擴增條件不同，批量使用前請優化反應條件。

- Pfu高保真性是相對於其他高溫聚合酶而言，擴增的錯誤率要低一些，不代表無錯誤擴增，無論是什麼酶，以克隆為目的要求序列 100%正確的，必須測序驗證，同時要測定多個克隆。

- 如果多個克隆測序結果在同一個位點有誤，通常不是擴增所致。