

## M5 Pfu DNA Polymerase 使用说明书

Product	Unit	Cat.#
M5 Pfu DNA Polymerase	500U	MF614-01
M5 Pfu DNA Polymerase	5x500U	MF614-05

**【Storage】** : Shipped at -20°C.

### 【产品介绍】 :

Pfu DNA Polymerase 是通过大肠杆菌表达纯化的重组酶, 具有 5'-3'DNA 聚合酶活性和 3'-5'外切酶活性, 因此在 DNA 扩增过程中具有纠错能力, 其保真性是 Taq DNA Polymerase 的 6-8 倍。另外该酶与 Taq DNA Polymerase 相比具有更好的热稳定性, 对于高 GC 含量模板, 提高变性温度对它活性无影响。使用本产品扩增得到的 PCR 产物为平端, 不能直接用于 T/A 克隆, 如需进行 T/A 克隆则需要在其末端添加“A”或用平末端载体进行克隆。本产品适用于基因克隆、基因定点突变、SNP 和末端补平等实验。

### 【产品组分】 :

	MF614-01	MF614-05
Pfu DNA Polymerase, 5 U/μl	100 μl	5x100 μl
10xPCR Buffer	1.0 ml	5x1.0 ml

注意: 本产品的 10xPCR Buffer 中含有 25 mM 镁离子。

**【单位定义】** : 用活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物, 在 74°C, 30 分钟内, 将 10 nmol 脱氧核苷酸掺入到酸性不溶物质所需的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

**【质量控制】** : 经过多次柱纯化, SDS-PAGE 检测其纯度大于 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; 室温存放一个月, 无明显活性改变。

### 【操作步骤】 :

以下举例为以人基因组 DNA 为模板, 扩增 1 kb 的片段的 PCR 反应体系和反应条件, 实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

#### 1. PCR 反应体系

试剂	50 μl 反应体系	终浓度
10xPCR Buffer	5 μl	1x
dNTP Mix, 10 mM each	1 μl	200 μM each
Forward Primer, 10 μM	2 μl	0.4 μM
Reverse Primer, 10 μM	2 μl	0.4 μM
Template DNA	<0.5 μg	<0.5 μg/50 μl
Pfu DNA Polymerase, 5 U/μl	0.5 μl	2.5U/50 μl
ddH <sub>2</sub> O	up to 50 μl	

注意:

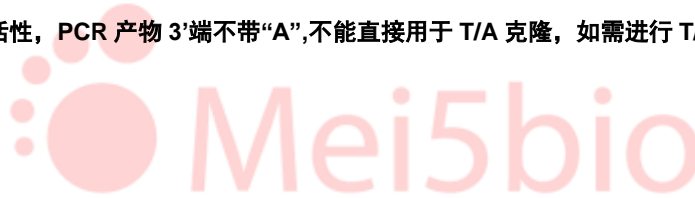
- 1) 用 Pfu 酶扩增时, 引物的纯度要求较高, 引物长度大于 18 个碱基, 引物浓度请以终浓度 0.1-1.0μM 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 由此优化反应体系。
- 2) Pfu 酶 3'-5'外切酶活性可能降解引物, 所以应先加 dNTP 后, 再加 Pfu 酶到反应体系中, 并立即进行 PCR 反应。

## 2. PCR 反应条件

步骤	温度	时间
预变性	94°C	2 min
以下 3 个步骤循环 25-35 次:		
变性	94°C	30 s
退火	55-65°C	30 s
延伸	72°C	60 s
终延伸	72°C	5 min

注意:

- 1) 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。
- 2) 一般实验中退火温度比扩增引物的熔解温度  $T_m$  低 5°C, 无法得到理想的扩增效率时, 适当降低退火温度; 发生非特异性反应时, 提高退火温度, 由此优化反应条件。
- 3) Pfu 酶具有 3'-5'外切酶活性, 所以 Pfu 酶扩增时延伸速度远比 Taq 酶低, 延伸时间根据所扩增片段大小设定, 本产品的扩增延伸速率为 1 kb/min。
- 4) 可根据扩增产物的下游应用设定循环数。如果循环次数太少, 扩增量不足; 如果循环次数太多, 错配机率会增加, 非特异性背景严重。所以在保证产物得率的前提下应尽量减少循环次数。
- 5) 本产品具有 3'-5'外切核酸酶活性, PCR 产物 3'端不带“A”, 不能直接用于 T/A 克隆, 如需进行 T/A 克隆则需要在其末端添加“A”或用平末端载体进行克隆。



**Please note: All products are "FOR RESEARCH USE ONLY AND ARE NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE"**