

Fast Pfu DNA Polymerase

产品组成

Cat. No.	8017050	8017100
Fast Pfu DNA Polymerase (1 U/ μ l)	50 μ l	100 μ l
5×Fast Pfu Buffer	0.5 ml	1 ml
ddH ₂ O	1 ml	1 ml × 2
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

- 20°C保存有效期为两年以上。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

Fast Pfu DNA Polymerase 是基于 *Pyrococcus Furiosus* DNA Polymerase 改造而成的新型高保真酶，具有极高的扩增效率和广泛的模板适应性，其保真性是普通 Taq 酶的 52 倍，是普通 Pfu 酶的 6 倍，且扩增速度达到 15 sec/kb，能够扩增长达 20 kb 的目的基因片段。

Fast Pfu DNA Polymerase 具有 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'外切酶活性，其 PCR 产物为平末端，可直接链接到平末端克隆载体，或者末端加 A 处理后再与 TA 载体连接。

单位定义

74°C, 30 min, 使 10 nm dNTP 掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量定义为 1 个活力单位。

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 DNA 残留，能有效扩增人类基因组中的单拷贝基因。

PCR 体系成分

1. 模板 DNA 的纯度：很多残留的核酸提取试剂会影响 PCR 反应，包括蛋白酶、蛋白变性剂(比如 SDS、胍盐)、高浓度盐(KAc、NaAc、辛酸钠等)和高浓度 EDTA 等。纯度不高的模板（比如煮沸法获取的模板）用量请勿超过 PCR 反应体系的 1/10（比如 50 μ l 反应体系中加入模板的体积不应超过 5 μ l）。如果模板 DNA 纯度太差，可使用 Simgen DNA 纯化试剂盒（Cat. No.2101050）对模板 DNA 进行纯化及浓缩，纯化后的模板使用量可多至 PCR 反应体系体积的 1/2。

2. 模板 DNA 用量：极微量的 DNA 也可以作为 PCR 模板，但为保证反应的稳定性，50 μ l 体系建议使用 10⁴ 拷贝以上的靶序列作为模板。模板 DNA 的推荐使用量：

人基因组DNA： 0.05 μ g~0.5 μ g/50 μ l PCR反应体系

大肠杆菌基因组DNA： 10 ng~100 ng/50 μ l PCR反应体系

λ DNA： 0.5 ng~5 ng/50 μ l PCR反应体系

质粒DNA： 0.1 ng ~ 10 ng/50 μ l PCR反应体系

如需用扩增产物作为模板再扩增，应至少将扩增产物稀释 1,000 至 10,000 倍后再作为模板使用，否则可能会出现涂抹条带或无特异性条带。

3. 引物浓度：一般每条引物配制的浓度为 10 μ M (50×)，工作浓度为 0.2 μ M。引物过量可能会出现非特异性扩增，引物过少则可能会降低扩增效率。

PCR 参数设置

1. 预变性：一般预变性为 94°C，1~5 min。变性温度过高或时间过长都会损失 Pfu 酶的活性。
2. 退火：退火温度是 PCR 的关键，温度过高可能降低产量，温度过低可能会产生引物二聚体或非特异性扩增。初次尝试 PCR 扩增建议尝试低于 Tm 5°C (如果两条引物 Tm 不同，参考较低的 Tm) 作为退火温度。一般引物合成公司会提供所合成引物的 Tm，也可以根据此公式估算引物 Tm： $Tm = 2^{\circ}C \times (A+T) + 4^{\circ}C \times (G+C)$ 。最佳退火温度需要进行梯度 PCR 确定。
3. 延伸：延伸温度通常为 72°C，延伸时间长短取决于目的 DNA 片段长度，以 15 sec/kb 计算所需延伸时间，时间过长可能会导致非特异性增加。循环结束后，继续延伸 5~10 min，以获得完整的双链产物。
4. 循环数：一般使用 25~35 个循环，低拷贝模板可适当增加循环数。但过多的循环数可能会增加非特异性扩增，却不会增加特异性产物。

使用方法

1. 将 5×Fast Pfu Buffer、dNTPs、ddH₂O、模板 DNA 和引物室温解冻，置于冰上。
2. 将解冻后的各个组分上下翻转混合均匀，按下表依次加入各组分配制 PCR 反应体系：

ddH ₂ O	(36-n) μl
5×Fast Pfu Buffer	10 μl
Primer 1 (10 μM)	1 μl
Primer 2 (10 μM)	1 μl
dNTPs (10 mM each)	1 μl
Fast Pfu DNA Polymerase	1 μl
模板	n μl
Total	50 μl

注意：

- 5×Fast Pfu Buffer 使用前必须充分混合均匀，否则将影响 PCR 效果。
 - 体系中已含有终浓度为 2 mM Mg²⁺，如有特殊需要，可用 50 mM MgSO₄，以 0.2-0.5 mM 为间隔向上摸索 Mg²⁺ 最佳使用浓度。
 - Fast Pfu DNA Polymerase 必须在加入 dNTPs 后再加入，否则 Fast Pfu DNA Polymerase 在不含 dNTPs 的条件下可能会启动 3'→5' 外切酶活性，开始降解引物。
 - 对于高 GC 模板，建议配套使用 GC-Rich Buffer (Cat. No.7705005)，或者添加终浓度为 3%-8% 的 DMSO。
 - 上述例子为 50 μl 反应体系所加的组分，如果需要其他体积的反应体系，请按比例增减各组分。
3. 手指轻弹 PCR 反应管充分混匀，低速离心数秒使溶液沉降到管底。
 4. PCR 反应循环设置举例

94°C 3 min	}	30 Cycles
94°C 30 sec		
※55°C 30 sec		
§ 72°C 1 min		
72°C 5 min		

※以实际最佳退火温度为准。

§ 以 15 sec/kb 计算。例如扩增片段长度为 4 kb 时，延伸时间设置为 1 min。
 5. 结果检测：取 5-10 μl 扩增产物与 Loading Buffer 混匀后进行琼脂糖凝胶电泳检测。