



Pfu DNA Polymerase

产品信息:

组成	AT103-01	AT103-02
Pfu DNA Polymerase (2.5U/μl)	250U	250U×10
10×Pfu Buffer	1ml	1ml×10

储存条件: -20℃ 保存

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, 其扩增的 PCR 产物为平端。

活性单位:

1 单位 (U) *Pfu DNA Polymerase* 活性定义为在 74℃、30 分钟内, 以活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板引物, 将 10 nmol 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:

20mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, Stabilizers, 50% glycerol。

10×Pfu Buffer (含 Mg²⁺):

200 mM Tris-HCl (pH8.8), 100 mM KCl, 100 mM(NH₄)₂ SO₄, 20 mM MgSO₄, 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 5'→3'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 1kb 如扩增片段小于 4kb; 延伸速度为每分钟 0.5kb 如扩增片段大于 4kb。同时 Pfu 酶的 5'→3'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, T_m 在 55-80℃ 之间, 引物浓度在 0.1-0.5μM 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℃, 对 Pfu 酶的活性无影响。

建议的 PCR 条件: (以 50μl 反应体系为例)

Template	<0.5μg
Forward Primer(10 μM)	1μl
Reverse Primer(10 μM)	1μl
10×Buffer(With MgSO ₄)	5μl
dNTP Mixture(各 2.5mM)	4μl
Pfu DNA polymerase(5U/μl)	0.5-1μl
ddH ₂ O	up to 50μl

PCR 反应循环的设置:

94℃:	2-5 min	} 30 cycles
94℃:	30 sec	
50-60℃:	30 sec	
72℃:	2 min/1kb	
72℃:	5-10 min	