



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301或800-8283301
订货e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

Pfu DNA Polymerase

产品编号	产品名称	包装
D7217	Pfu DNA Polymerase	1000U

产品简介:

- Pfu DNA Polymerase简称Pfu酶，是最常用的高保真DNA聚合酶之一。
- Pfu DNA Polymerase是一种来源于嗜热菌*Pyrococcus furiosus*的高度热稳定的DNA聚合酶。Pfu酶的分子量为90kDa。Pfu酶可以催化5'至3'方向的依赖于DNA模板的脱氧核苷酸的聚合。和Taq酶不同，Pfu酶有3'至5'的外切酶活性(proofreading activity)。另外，Pfu酶有5'至3'外切酶活性，但Pfu酶没有反转录酶活性。
- 由于Pfu酶有3'至5'的外切酶活性，因此在PCR扩增过程中出错的几率大大降低，出错率为 2.6×10^{-6} per nt per cycle。Pfu的出错率不仅远远低于Taq酶，也低于一些其它的高保真DNA聚合酶例如Vent、DeepVent、Pwo、Tli等，因此Pfu酶常作为首选的高性价比的高保真DNA聚合酶。
- **来源:** 本Pfu DNA Polymerase为recombinant Pfu DNA Polymerase，通过大肠杆菌表达纯化获得，和纯化获得的天然Pfu DNA Polymerase在各方面的性质相同。
- **用途:** 高保真PCR (high fidelity PCR)、点突变、双平端PCR克隆等。
Pfu酶扩增出来的DNA片段为双平端，可以用于双平端克隆，但不能用于常规的T载体克隆。
dUTP和dITP或含有dUTP和dITP的引物不能用于Pfu酶介导的PCR扩增反应。
- **活性定义:** One unit of the enzyme catalyzes the incorporation of 10 nmol of deoxyribonucleotides into a polynucleotide fraction (adsorbed on DE-81) in 30 min at 72°C. Enzyme activity is assayed in the following mixture: 20 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 2 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA, 0.75 mM activated calf thymus DNA, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 MBq/ml [³H]-dTTP.
- **纯度:** 不含DNA内切酶、外切酶和磷酸酯酶，不含RNA酶，满足常规PCR反应要求。
- **酶储存溶液:** 20 mM Tris-HCl (pH 8.2), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.1% (v/v) Nonidet P40, 0.1% (v/v) Tween 20 and 50% (v/v) glycerol.
- **10X Pfu Buffer (with Mg²⁺):** 200 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 100 mM KCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1 mg/ml BSA.
- **失活或抑制:** 酚氯仿抽提可以使Pfu酶失活。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7217-1	Pfu DNA Polymerase (5U/μl)	1000U
D7217-2	10X Pfu Buffer (with Mg ²⁺)	1ml×5
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存。

注意事项:

- 由于PCR反应非常灵敏可以扩增目的基因序列超过1000万倍，在使用Pfu酶时请注意避免微量待扩增DNA的污染，并尽量考虑设置不加模板的空白对照以确认是否有待扩增DNA的污染。
- Pfu DNA polymerase在扩增DNA片段时的出错率非常低，但其扩增效率也比较低。对于出错率要求不高的情况，例如RT-PCR进行定量或半定量，推荐使用Taq DNA polymerase。在扩增效率和出错率需要兼顾的情况，可以选择BeyoTaq DNA polymerase。在扩增2kb以下DNA片段时，Pfu酶和Taq酶的扩增效率相近。在准确性要求很高的情况下，须选择Pfu酶。
- Pfu酶有3'至5'的外切酶活性，在没有dNTP的情况下可以降解引物。因此Pfu酶一定要最后加入，并且要在冰浴上操作。
- 不能使用Taq酶的PCR Buffer来替代Pfu酶的PCR Buffer。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. PCR反应体系的设置:

- a. 溶解并混匀PCR反应所需的各种溶液。将Pfu DNA Polymerase置于冰浴上或冰盒内。

- b. 参考下表在冰浴上设置PCR反应(如果有多个类似的PCR反应,可以先配制大体积的包含水、buffer、dNTP和Pfu酶的混合物,然后分装到各PCR反应管内。根据情况,有时混合物中可以包括引物):

试剂	最终浓度	体积
双蒸水或Milli-Q水	-	(36.75-x) μ l
10X Pfu Buffer (with Mg ²⁺)	1X	5 μ l
dNTP (2.5mM each)	0.2mM each	4 μ l
模板DNA	10pg-1 μ g*	x μ l
引物混合物(10 μ M each)	0.8 μ M	4 μ l
Pfu DNA Polymerase (5U/ μ l)	1.25U/50 μ l	0.25 μ l
总体积		50 μ l

*对于不同类型的模板在50 μ l反应体积中推荐用量如下: 哺乳动物基因组DNA: 0.1-1 μ g; 大肠杆菌基因组DNA: 10-100ng; 质粒DNA: 0.1-10ng。过多的模板DNA容易导致非特异性的PCR产物。

- c. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀, 室温离心数秒, 使液体体积聚于管底。
d. 如果所使用的PCR仪有热盖则省略本步骤。如果PCR仪没有热盖, 则在管内滴入一滴矿物油(mineral oil, ST275)。
e. 各设置好的PCR反应管置于PCR仪上, 开始PCR反应。

2. PCR反应参数的设置可以参考如下示例:

STEP1(起始变性): 94°C 3min

STEP2(变性): 94°C 30sec

STEP3(退火): 55°C 30sec

STEP4(延伸): 72°C 2min

STEP5(循环): Go To STEP2 for 30 cycles

STEP6(最终延伸): 72°C 10min

STEP7(临时保存): 4°C forever

- a. PCR反应的设置需根据模板、引物、PCR产物的长度和GC含量等条件的不同设定不同的PCR反应条件包括温度、时间和循环数等。
b. STEP4(延伸)的时间设置需根据PCR产物的长度进行设置, 通常每kb产物的延伸时间为2分钟。例如PCR产物的长度为1kb, 则延伸时间可以设置为2分钟, PCR产物的长度为2kb, 则延伸时间可以设置为4分钟, 以此类推。
c. 对于初次进行的PCR, 为尽量确保可以扩增出预期的PCR产物, 可以把循环数设置为35。对于需进行半定量或定量的PCR反应循环数一定要进行适当优化, 使PCR反应没有达到平台期。

常见问题:

1. PCR产物非常少或没有特异性条带。

- a. 引物设计不佳是PCR过程中最常见的问题。请选择适当的引物设计软件进行引物设计, 注意引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在加入酶切位点等的引物中, 一定要注意加入酶切位点等后整条引物的GC含量、二级结构、二聚体、退火温度、长度、特异性等方面的问题。在原有引物效果不佳的情况并且阳性对照引物可以正常工作的情况下, 可以考虑更换引物。
b. 待扩增片段GC含量偏高。GC含量较高的情况下PCR会变得相对比较困难, 此时可以使用适合扩增高GC含量DNA片段的GC-rich buffer, 并相应地根据GC-rich buffer的要求或说明调整PCR反应参数的设置。
c. 长片段扩增。尽管Pfu DNA polymerase可以扩增较长的DNA片段, 但大多数时候比较适合扩增5kb以下的片段, 更长片段的扩增推荐使用其它更适合长片段扩增的DNA聚合酶。
d. PCR反应设置时在室温进行容易导致非特异性条件。推荐在冰浴上设置PCR反应。
e. 由于引物存在一定的二级结构或存在一定的引物二聚体, 或引物偏短, 导致退火效果不佳。此时可以采用Touch down等方法进行退火, 通常采用从65°C逐步缓慢降温到55°C或50°C的方法, 使退火更加充分。
f. 退火温度不佳, 需要优化。如果有温度梯度PCR仪, 则可以设置退火的温度梯度, 摸索退火的最佳温度。如果没有温度梯度PCR仪, 则可以通过多次PCR反应摸索最佳的退火温度。
g. 延伸时间不足。可按照每1kb片段延伸3分钟进行设置, 对于较难扩增的片段可以设置为每1kb片段延伸5分钟。
h. 待扩增片段GC含量较高或长度较长, 变性不够充分。可以调节起始变性条件至95°C 1min甚至95°C 2-4min。
i. 在不同PCR仪上进行PCR反应, 避免有时PCR仪出现问题。
j. 循环数不足, 适当延长PCR的循环数。通常循环数最高不必超过40, 常用的循环数范围为25-35。
k. 模板含量太低, 适当加大模板量, 或采用巢式PCR(nested PCR)或二次PCR。巢式PCR即为在原先设计的PCR引物内侧再设计一对PCR引物, 然后对第一次PCR产物进行稀释后再进行一次PCR扩增, 这样一方面可以起到扩增作用, 同时也可以从第一次PCR产物中扩增出特异性条带。二次PCR则为比较简单地用原有引物对第一次PCR产物进行稀释后再进行一次PCR扩增, 可以起到扩增作用, 但不能去除非特异性条带。
l. 模板中含有抑制PCR反应的物质, 可以用适当的DNA纯化方法例如柱纯化等纯化模板DNA。
m. 当产生较多非特异性条带时, 可以适当提高退火温度。
n. 扩增效率偏低。选择可以兼顾扩增效率和准确率的DNA polymerase, 例如BeyoTaq DNA polymerase等。
o. 注意设置适当的阳性对照和阴性对照通常会有很大帮助。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D7205	Taq DNA Polymerase	200U
D7207	Taq DNA Polymerase	1000U
D7209	Taq DNA Polymerase	5000U
D7216	Pfu DNA Polymerase	200U
D7217	Pfu DNA Polymerase	1000U
D7218	BeyoTaq DNA Polymerase	200U
D7219	BeyoTaq DNA Polymerase	1000U
D7220	BeyoFusion™ DNA Polymerase	200U
D7221	BeyoFusion™ DNA Polymerase	1000U
D7222	BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase	200U
D7222B	BeyoFusion™ Plus DNA Polymerase	1000U
D7228	2X PCR Master Mix	400次
D7232	PCR Kit with Taq	400次
D7233	PCR Kit with Taq	2000次
D7237	PCR Kit with BeyoTaq	400次
D7251	Easy-Load™ PCR Master Mix (Blue, 2X)	400次
D7255	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	400次
D7259	Easy-Load™ PCR Master Mix (Orange, 2X)	400次

使用本产品的文献:

1. Wang H, Feng F, Wang XP, Wang RS, Wu Y, Zhu MG, Zhang H, Zhuang ZX . Dendritic cells pulsed with Hsp70 and HBxAg induce specific antitumor immune responses in hepatitis Bvirus-associated hepatocellular carcinoma. Mol Med Rep. 2016 Feb;13(2):1077-82.
2. Ai J, Sun JH, Wan T, Ma J, Feng L, Yao K.Generation of an anti-angiogenic endothelial progenitor cell line via endostatin gene transfer.Mol Med Rep . 2018 Apr;17(4):5814-5820
3. Xiao R,Li C,Wang C,Cao Y,Zhang L,Guo Y,Xin Y,Zhang H,Zhou G.Adipogenesis associated Mth938 domain containing (AAMDC) protein expression is regulated by alternative polyadenylation and microRNAs.FEBS Lett. 2019 Jul;593(14):1724-1734
4. Jinhui Cui,Dan Wu,Qian Sun,Xiuzhu Yang,Dandan Wang,Miao Zhuang,Yiheng Zhang,Mingzhe Gan,Dan Luo.A PEGDA/DNA Hybrid Hydrogel for Cell-Free Protein Synthesis Front Chem. 2020 Feb 18;8:28.;doi: 10.3389/fchem.2020.00028
5. Ling Kong,Dan Jiang,Cheng He,Jing Xia,Haixia Wei,Lijuan Zhou,Hongjuan Peng.TgROP18 targets IL20RB for host-defense-related-STAT3 activation during Toxoplasma gondii infection PARASITE VECTOR. 2020 Aug 7;13(1):400.;doi: 10.1186/s13071-020-04251-7.

Version 2021.09.01