



Pfu DNA 聚合酶使用方法

我们推荐您使用本公司免费赠送的 PCR 染料，一是使扩增反应更趋优化；二是扩增完毕无需再加上样染料，可直接上样电泳。

1. 建议在 0.2ml 或 0.5ml PCR 反应管中加入下列成分：

	20 μ l 反应体系	50 μ l 反应体系
DNA 模板	5~50ng	10~100ng
上游引物	10~20pmol	20~50pmol
下游引物	10~20pmol	20~50pmol
Pfu DNA 聚合酶	1~1.5U	2~3U
10xPfu 缓冲液	2 μ l	5 μ l
PCR 染料	2 μ l	5 μ l
dNTPs (10mM)	0.5 μ l	1 μ l

2. 补超纯水至 20 μ l 或 50 μ l，充分混匀后短暂离心。若基因扩增仪不防蒸发，加入 1~2 滴石蜡油。
3. 推荐的 PCR 扩增条件（仅供参考）：

94 $^{\circ}$ C	2.5min	} 25~35 Cycles
94 $^{\circ}$ C	45sec	
50~65 $^{\circ}$ C	1min	
72 $^{\circ}$ C	1.5min	
72 $^{\circ}$ C	5~10min	

常见问题解答

1. 使用 Pfu 可以扩增多长的片段？

对于简单的模板，Pfu 应该可以很好的扩增 3kb 以下的片段。扩增更长片段时，能否成功扩增主要与模板和引物的设计有关。



2. 使用 Pfu 进行 PCR 扩增后的 PCR 产物能否进行 TA 克隆？

不能直接进行 TA 克隆。首先要将 PCR 产物进行纯化，然后在 dATP 存在条件下用 Taq 酶 72℃ 处理 15 分钟进行 3'末端加 A 处理，再与 TA 载体连接。

3. 用同单位的 Pfu 和 Taq 扩增，为什么 Pfu 扩增效率比 Taq 酶低？

因为高保真性能的 Pfu 聚合酶具有 3'到 5'核酸外切酶的活性，扩增过程中如果产生了错配的碱基，它可以将其切掉，从而保证了扩增的准确性。正是由于此酶具有核酸外切酶的功能，往往扩增效率比 Taq 要低，而且还容易降解引物，因而在设置 PCR 反应时，应最后加入 Pfu 酶为好。

三种耐热 DNA 聚合酶比较

耐热聚合酶	特点及应用
Taq DNA Polymerase	<ul style="list-style-type: none"> ● 延伸速度最快的耐热 DNA 聚合酶，理想状态下为 2~4kb/min。可以很好的扩增 10kb 以下的 DNA 片段。 ● 用于普通 PCR 扩增，其 PCR 产物含 3'端单个 dA，能进行 TA 克隆。
Taq-red DNA Polymerase	<ul style="list-style-type: none"> ● 除具有普通 Taq DNA Polymerase 的特点外，该酶呈红色，加取样易于观察更方便；PCR 完成后可直接电泳，无需再加上样染料。 ● 用于普通 PCR 扩增，其 PCR 产物含 3'端单个 dA，能进行 TA 克隆。
Pfu DNA Polymerase	<ul style="list-style-type: none"> ● DNA 聚合时的保证延伸速度 600bp/min，该酶具有独特的 3'→5'外切核酸酶活性，能修正错配碱基，从而保证 DNA 扩增的高保真度。适用于高保真扩增长度为 3kb 以下的片段。 ● 保真度要求较高，片段比较短，如点突变、基因筛选等。

北京赛百盛基因技术有限公司

全国统一热线：400 666 3029

地址：北京市海淀区上地四街 1 号院 2 号楼 202 室 邮编：100085

电话：010-62969345/46, 010-82784296/92 传真：010-82784290

Email: info@sbsbio.com

<http://www.sbsbio.com>