

# Pfu DNA聚合酶

| 组分                                     | #M0011 | #M0012   |
|--|--------|----------|
| Pfu DNA聚合酶 (2.5 U/μl)                  | 40 μl  | 40 μl×5  |
| 10× 反应缓冲液 (包括20 mM MgSO <sub>4</sub> ) | 0.6 ml | 0.6 ml×5 |
| 10× 反应缓冲液 (无MgSO <sub>4</sub> )        | 0.6 ml | 0.6 ml×5 |
| 25 mM MgSO <sub>4</sub>                | 0.6 ml | 0.6 ml×5 |

**概述:** Pfu DNA聚合酶是从克隆有*Pyrococcus furiosus* DNA聚合酶基因的大肠杆菌中分离出来的。Pfu DNA聚合酶有3'→5'外切酶的活性, 它能纠正DNA扩增过程中产生的错误, 是目前已发现的所有天然耐热DNA聚合酶中出错率最低的<sup>(1)</sup>。

**来源:** *E. coli*菌株, 包含有从*Pyrococcus furiosus*中克隆的基因<sup>(2)</sup>。

#### 应用:

1. 常规PCR。
2. 基因的高保真PCR, 克隆和表达。
3. 反转录PCR (RT-PCR)。
4. 平末端PCR克隆。
5. 定点突变。

**贮存溶液:** 20 mM Tris-HCl (pH 8.2 @ 25°C), 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0.1 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.1% Nonidet™ P-40 (NP-40) (V/V), 0.1% Tween 20 (V/V), 50%甘油 (V/V)。

**10×反应缓冲液 (包括20 mM MgSO<sub>4</sub>):** 200 mM Tris-HCl (pH 8.8 @ 25°C), 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 1 mg/ml无核酸酶活性的BSA, 1% Triton X-100 (V/V), 20 mM MgSO<sub>4</sub>。

**活性定义:** 在72°C下反应30分钟, 能催化10 nmol的dNTPs聚合为多核苷酸片段的酶量定义为1个活性单位 (U)。

**储存温度:** -20°C。

#### 质量控制检测:

**核酸外切酶活性:** 在50 μl反应体系中, 10 U本酶与0.2 mM dNTPs和1 μg的Hind III消化的λDNA于37°C温育4小时, 电泳条带无明显变化。

**核酸内切酶活性:** 在50 μl反应体系中, 10 U本酶与0.2 mM dNTPs和1 μg的pUC19质粒于37°C温育4小时, 电泳条带无明显变化。

**纯度:** 经SDS-PAGE (考马斯亮蓝染色) 检测其纯度大于95%。

#### 参考文献:

1. Lunberg, K.S. et al. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*. 108:1-6.
2. Sambrook, J. et al. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (3rd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

#### Pfu DNA聚合酶PCR反应体系和程序:

1. 50 μl反应体系, 冰上操作

| 成分                    | 体积 (μl)  | 终浓度         |
|-----------------------|----------|-------------|
| 10×反应缓冲液              | 5 μl     | 1×          |
| dNTP Mix (10 mM each) | 1 μl     | 200 μM each |
| 上游引物 (10 μM)          | 0.5-5 μl | 0.1-1 μM    |
| 下游引物 (10 μM)          | 0.5-5 μl | 0.1-1 μM    |
| DNA模板                 | 根据具体情况添加 |             |
| Pfu DNA聚合酶*           | 0.5-1 μl | 1.25-2.5单位  |
| 水                     | 补充至50 μl |             |

[\*]: 当微量体积的酶比较难吸取时, 可将酶稀释于1×反应缓冲液中。



# Pfu DNA聚合酶

2. 混匀并短暂离心。

如果PCR仪没有热盖功能，可在液体表面添加少许石蜡油防止蒸发。

3. PCR反应程序

| 步骤       | 温度                      | 时间        |
|----------|-------------------------|-----------|
| 预变性      | 95°C                    | 1-3 min   |
| 25-35个循环 | 95°C                    | 30 s      |
|          | $T_m - 5^\circ\text{C}$ | 30 s      |
|          | 72°C                    | 2 min/kb  |
| 延伸       | 72°C                    | 5 -15 min |
| 保存       | 4 -10°C                 |           |