



2×Pfu MasterMix (Dye)

目录号：CW0686S (1 ml)

CW0686M (5 ml)

保存条件：-20℃。如需频繁使用，可存放于2-8℃。

产品内容

Component	CW0686S	CW0686M
	1 ml	5 ml
2×Pfu MasterMix (Dye)	1 ml	5×1 ml
ddH ₂ O	1 ml	5×1 ml

注意：2×Pfu MasterMix含有Pfu DNA Polymerase, 3 mM MgCl₂和400 μM each dNTP。

产品简介

本品为Pfu DNA Polymerase、Mg²⁺、dNTPs以及PCR稳定剂和增强剂组成的预混体系，浓度为2×。Pfu DNA Polymerase具有5'-3' DNA聚合酶活性和3'-5'外切酶活性，因此在DNA扩增过程中具备纠错能力。与Taq DNA Polymerase相比具有高保真性（Taq酶的6-8倍）和更好的热稳定性。预配好的PCR混合液使操作更加简单快捷，可最大限度地减少人为误差和污染。独创的MasterMix配方使整个反应体系非常稳定，重复性好。本产品已加入染料（蓝色），反应结束后可直接进行电泳检测。本产品所含的Pfu DNA聚合酶具有错配率低，耐高温的特点，适用于基因克隆、基因定点突变、SNP和末端补平等反应。

质量控制

经检验无外源核酸酶活性；PCR方法检测无宿主残余DNA；能有效地扩增多种基因组中的单拷贝基因；2-8℃存放三个月，活性无明显改变。

使用方法

以下举例为以人基因组DNA为模板，扩增1 kb的片段的PCR反应体系和反应条件，实际操作中应根据模板、引物结构和目的片段大小不同进行相应的改进和优化。

1. PCR反应体系

试剂	50 μ l反应体系	终浓度
2 \times Pfu MasterMix (Dye)	25 μ l	1 \times
Forward Primer, 10 μ M	2 μ l	0.4 μ M
Reverse Primer, 10 μ M	2 μ l	0.4 μ M
Template DNA	<0.5 μ g	<0.5 μ g/50 μ l
ddH ₂ O	up to 50 μ l	

注意：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，引物浓度请以终浓度0.1-1.0 μ M作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。

2. PCR反应条件

步骤	温度	时间
预变性	94 $^{\circ}$ C	2 min
变性	94 $^{\circ}$ C	30 s
退火	55-65 $^{\circ}$ C	30 s
延伸	72 $^{\circ}$ C	60 s
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min

} 25-35 个循环

注意：

- 1) 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 $^{\circ}$ C，对Pfu酶的活性无影响。
- 2) 一般实验中退火温度比扩增引物的溶解温度T_m低5 $^{\circ}$ C，无法得到理想的扩增效率时，适当降低退火温度；发生非特异性反应时，提高退火温度，由此优化反应条件。
- 3) Pfu酶具有3'-5'外切酶活性，所以Pfu酶扩增时延伸速度远比Taq酶低，延伸时间根据所扩增片段大小设定，本产品的扩增延伸速率为1 kb/min。
- 4) 可根据扩增产物的下游应用设定循环数。如果循环次数太少，扩增量不足；如果循环次数太多，错配机率会增加，非特异性背景严重。所以在保证产物得率的前提下应尽量减少循环次数。
- 5) 本产品具有3'-5'外切核酸酶活性，PCR产物为平端不能直接用于T/A克隆，如需进行T/A克隆则需要在其末端添加“A”或用平末端载体进行克隆。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途