

Hotstart Pfu Mix

货号: P2051, P2052

产品简介

Hotstart Pfu Mix 是 2X 浓缩的 PCR 扩增预混合溶液, 含有 Hotstart Pfu DNA 聚合酶、dNTP 混合物、缓冲液等 PCR 扩增必需组分 (模板与引物除外)。使用时, 仅需在扩增体系中加入模板和引物即可进行 PCR, 大大简化操作过程, 缩短操作时间, 降低污染几率 (加样次数减少)。同时, 由于体系内含有热启动修饰的 Hotstart Pfu DNA 聚合酶以及优化剂, 能够显著增强 PCR 扩增的灵敏度与特异性。

Hotstart Pfu DNA 聚合酶是一种创新型的类抗体技术修饰的热启动高保真酶, 其保真性是普通 Taq DNA 聚合酶的 10 倍左右。该酶在室温下活性被完全封闭, 依赖温度激活酶活性, 可有效减少非特异性扩增。扩增片段长度可达 5 kb (简单模板), 产物包含平末端和粘性末端两种类型。延伸速率为 30s/kb (70-75°C, 简单模板可达 10s/kb)。该酶具有 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'外切酶活性。Hotstart Pfu DNA 聚合酶采用先进的生产技术, 动物源性 DNA 污染为零, 稳定性更强, 具有抗体法热启动酶不可比拟的优势。同时, 预变性时间缩短至 3 分钟, 工作效率比大多数化学修饰法热启动酶更高, 是一款非常新颖、实用的产品。

产品组成

| Component | P2051 | P2052 |
|---------------------|-------|----------|
| 2X Hotstart Pfu Mix | 1 ml | 1 ml × 5 |
| 超纯水 | 1 ml | 1 ml × 5 |

本产品分含体系中包含溴酚蓝、不含溴酚蓝两类。体系中包含溴酚蓝的产品, PCR 扩增产物可直接电泳检测。这两类产品的扩增性能无差异。如无特别说明提供体系中包含不含溴酚蓝的包装。

保存条件

-20°C 保存 2 年。

质量控制

纯度检测: 经质量检测, 产品不含脱氧核糖核酸内切酶、脱氧核糖核酸外切酶和核糖核酸酶污染。

功能检测: PCR 方法检测无宿主残余 DNA, 能有效扩增人基因组中的单拷贝基因。

应用举例

1. 配制反应体系

请于冰上配置反应体系, 体系大小与组分用量可调整, 以下供参考:

| Ordinal | Component | Volume | Final concentration |
|----------|--|-------------------------|-------------------------|
| | | (50 µl reaction volume) | (50 µl reaction volume) |
| 1 | 2X Hotstart Pfu Mix | 25 µl | 1X |
| 2 | upstream primer (10 µM) ^[1] | 2 µl | 0.4 µM |
| 3 | downstream primer (10 µM) ^[1] | 2 µl | 0.4 µM |
| 4 | template DNA ^[2] | 1-4 µl | <1µg |
| 5 | 超纯水 ^[3] | To 50 µl | - |
| optional | MgCl ₂ (MgSO ₄)/PCR Enhancer ^[4] | Variable | - |

[1] 引物终浓度建议范围: 0.1-1 µM。特异性差时可降低浓度, 效率低时可提高浓度。

[2] 不同模板最佳用量不同, 部分 DNA 模板建议用量如下表 (50 µl 反应体系)。

| Template | 人类基因组 DNA | λDNA | 大肠杆菌基因组 DNA | 质粒 DNA |
|----------|-----------|-----------|-------------|------------|
| Dosage | 0.1µg-1µg | 0.5ng-5ng | 10ng-100ng | 0.1ng-10ng |

[3] 可单独订购超纯水 (Cat. #: P9021/P9022/P9023)。

[4] 可单独订购 25mM MgCl₂ (Cat. #: P9031) 和 PCR Enhancer (Cat. #: P9041)。

2. 设定反应程序进行 PCR 反应

| Stage | Temperature | Time | Number of Cycles |
|----------------------|------------------------|-------------------------|------------------|
| Initial Denaturation | 95°C | 2 min | 1 |
| Denaturation | 95°C | 10 sec | |
| Annealing | 55-68°C ^[1] | 20 sec | 25-35 |
| Extension | 72°C | Variable ^[2] | |
| Final Extension | 72°C | 5-10 min | 1 |

[1] 退火温度应根据 T_m 值较低的引物来设。

[2] 延伸时间按 30s/kb 来设最佳 (简单模板可达 10s/kb)。

3. 分析结果

反应产物可直接进行琼脂糖凝胶电泳，通过凝胶成像设备观察目的条带的扩增情况。如有需要，可进行割胶回收。

无产物或产物量少的改进措施有：1 降低退火温度至 $T_m-8^{\circ}\text{C}$ ；2 减少抑制剂的影响，如提取的基因组 DNA 中含有抑制扩增的成分，需要高倍稀释（1: 10000）后使用；3 采用乙醇沉降洗脱，提高模板 DNA 的纯度；4 使用 PCR 添加剂，如 PCR Enhancer (Cat. #: P9041) 可提高高 GC 模板产量。

操作注意事项

1. 为避免酶的校正活性导致引物降解，请于冰上配置反应体系。
2. 本品的扩增产物有平末端和 3'-dA 末端两种。如要进行 TA 克隆，请先进行加 A 反应，以提高克隆效率。（加 A 反应：参考如下体系， 72°C ，15-30min）

| | |
|--|---------------------|
| PCR（纯化）产物 | 1-7 μl |
| 10 \times Taq Buffer (Mg ²⁺ Plus) | 1 μl |
| dATP | 0.2 mM |
| Taq DNA 聚合酶 | 5U |
| 超纯水 | To 10 μl |

3. dUTP、dITP 和含有这些核苷酸的引物不能用于 Pfu DNA 聚合酶催化的 PCR 扩增。因为该酶与含有尿嘧啶和次黄嘌呤的 DNA 模板结合后会中止 DNA 聚合反应。

引物设计注意事项

引物长度一般在 15-30 个碱基之间；上下游引物 3'末端避免互补，避免出现 3 个以上重复的 G 或 C，或出现发夹结构，否则会产生非特异性扩增；GC 含量控制在 40-60%，且上下游引物 GC 含量尽量接近； T_m 值控制在 $55-65^{\circ}\text{C}$ 之间，且上下游引物 T_m 值尽量接近，额外附加序列（酶切位点、修饰等）是非模板匹配序列，不参与 T_m 值计算。

本品仅供科学研究使用。