**SiDoTek™ Fast Pfu DNA polymerase**

**快速高保真DNA聚合酶**

**目录号：SDMR1-2a**

**储存条件：-30 ~ -15℃保存2年，≤0℃运输**

**浓度：5U/μL**

**产品内容：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **组分** | **规格****SDMR1-2a** | **规格****SDMR1-3a** |
| 10×HiFi Buffer（Mg2+ free） | 1 mL |  |
| MgCl2（25mM） | 1 mL | 5×AA07-500 |
| Fast Pfu DNA Polymerase（5U/μL） | 100 μL（500U） | （5×大包装） |

**产品简介**

普通Pfu聚合酶扩增能力差、延仲速度缓慢(0.5kb/min)、扩增产量低，给众多实验者带来不便。Fast Pfu DNA Polymerase是经基因工程改造获得的新一代高保真DNA聚合酶，用于快速PCR扩增。与Pfu酶相比，Fast Pfu DNA Polymerase在保持高保真性的同时，兼具有合成DNA速度快(2~3kb/min,是普通Pfu酶的4~6倍)，抗干扰能力强以及PCR产物的产量获得方面有较显著的提升。本产品适用于有高保真要求的PCR扩增反应，尤其在复杂模板扩增，平端克隆，基因定点突变，长片段扩增，全基因合成等方面具有优秀的表现。

**产品特色**

快速扩增:Fast Pfu Polymerase 扩增速度在72℃保温15秒即可延伸 1kb左右。

高灵敏度:对模板DNA需求量较普通Pfu酶低。可从0.05 ng人基因组DNA模板中扩增出1.2kb特定基因片段。

强扩增能力:以λDNA为模板，扩增长度可达12kb，能高效扩增≤6kb片段。

高保真性:具有与Pfu酶相同的保真度。

**应用范围**

常规PCR

基因的高保真扩增、克隆和表达

基因的定点突变

细胞内基因突变分析

**活性定义**

1单位(U) Fast Pfu DNA Polymerase 活力定义为：在72℃ 30分钟内，将10 nmol 同位素标记的 4x dNTP 掺入到酸不溶物质中所需酶的量。

**酶贮存液**

20 mM Tris-HCl (pH8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1%Tween-20(v/v),

50% Glycerol(v/v),Stabilizers。

**注意事项**

1. 其扩增产物为平端可直接克隆于平端载体中，但不能直接用T/A克隆方式克隆。

2. 请于使用前确保产品完全解冻，彻底混匀后短暂离心，置于冰上备用，反复冻融会影响产品的性能。

3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**使用建议**

Fast Pfu DNA聚合酶产生的PCR产物为平滑末端，无3'端"A"突出，其PCR产物的克隆有两种方案:

1、PCR引物进行5'端加磷酸修饰或将PCR产物磷酸化处理后再直接克隆于平滑末端的载体中。

2、将产物3'末端加A后再与T载体连接。

由于Fast Pfu DNA聚合酶的校对活性可引起引物从3'端被部分降解。因此在设计引物时应适当增加引物的长度，理想的引物长度为20-30bp 碱基。另外为了减少由3'-5'外切酶活性引起的引物降解，尽量在冰上配制反应体系。

**PCR反应液组成（50μL）**

|  |  |
| --- | --- |
| **试剂** | **体积** |
| Fast Pfu DNA Polymerase （5U/μL ） | 0.5 μL |
| 10×HiFi Buffer（Mg2+ free） | 5 μL |
| 25 mM MgCl2  | X μL\* |
| dNTP (10mM) | 1 μL |
| 正向引物 (10μM) | 1~2 μL\* |
| 反向引物 (10μM) | 1~2 μL\* |
| 模板DNA | Y ng\* |
| DNase-Free Water | up to 50 μL |

**\*推荐引物终浓度为 0.2~0.4 μM，效果不佳时也可在0.1~1μM间进行调整。**

**\*对于大多数PCR反应，Mg2+推荐浓度为1.5~2.5 mM；可用25 mM MgCl2以0.5 mM为间隔摸索Mg2+最佳使用浓度。**

**\*基因组DNA推荐用量为10~400ng，模板为质粒或病毒DNA时，推荐用量为10pg~20ng。**

**PCR反应条件**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 95℃ | 3~5 min  | 预变性 |
| 95℃ | 15 sec |  |
| 58℃ | 20 sec | 30-35cycles |
| 72℃ | 2~3kb/min |  |
| 72℃ | 5 min  | 终延伸 |

**\* 退火温度需要根据引物的 Tm 值进行调整，一般设置成低于引物 Tm 3~5℃。**