

High-Fidelity DNA Polymerase

一代高保真酶

产品简介

本品是基于 Pyrococcus Furiosus DNA Polymerase，经基因工程改造而成。该酶具有 5' → 3' DNA 聚合酶活性和 3' → 5' 核酸外切酶活性，其保真性是 Taq DNA 聚合酶的 83 倍，是普通 Pfu DNA 聚合酶的 9 倍。酶溶液中添加常温可抑制聚合酶活性和 3' → 5' 核酸外切酶活性的两种单克隆抗体，可简便地进行高特异性的 Hot Start PCR，极大提高了扩增的检出率和产物的特异性。酶溶液中添加延伸因子使得该酶具有长片段扩增能力，扩增目的片段的长度可长达 13 kb。本产品配备了优化缓冲液，使得该酶适用于复杂模板的扩增。扩增产物为平末端。

产品规格

产品货号	N132015S	N132015M	N132015L
产品规格	100 U	500 U	1000 U

组分信息

组分编号	组分名称	N132015S (100 U)	N132015M (500 U)	N132015L (1000 U)
N132015-A	High-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μL)	100 μL	500 μL	500 μL × 2
N132015-B	2×PCR buffer (含 Mg ²⁺ , dNTPs)	3×1 mL	15×1 mL	30×1 mL
N132015-C	6×DNA Loading Buffer	1 mL	6×1 mL	12×1 mL

产品储存

-25~-15℃储存，有效期 1 年。

产品应用

基因克隆；复杂 DNA 模板扩增；高通量建库。

活性定义

用活性化的大马哈鱼精子 DNA 为模板/引物，74℃，30 min 内，摄入 10 nmol 的全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为 1 U。

操作注意

1. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

2. 本产品仅作科研用途!

操作说明

1. 推荐 PCR 反应体系

表 1 PCR 反应体系

组分	体积 (μL)	终浓度
模板**	x	-
High-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μL)	1	1 U/50 μL
2×PCR buffer (含 Mg ²⁺ , dNTPs)	25	1×
正向引物 F (10 μM)	2	0.4-0.5 μM
反向引物 R (10 μM)	2	0.4-0.5 μM
ddH ₂ O	Up to 50	-

【注】：使用前请务必将其彻底混匀。

- 1) 试剂使用：使用前要充分解冻混匀。
- 2) Mg²⁺终浓度：体系终浓度为 2 mM。如有特殊需要，可用 50 mM MgCl₂，以 0.2-0.5 mM 为间隔向上摸索。
- 3) 高 GC 模板：在体系中加入终浓度为 3% 的 DMSO 可能有利于扩增。
- 4) 不同模板的推荐使用量 (25 μL 反应体系)：

表 2 不同模板的推荐使用量

模板种类	扩增片段 1 kb-10 kb
基因组 DNA	50 ng-200 ng
质粒或病毒 DNA	10 pg-20 ng
cDNA	1-2.5 μL (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)

2. PCR 扩增程序：有以下三种程序可选择，优先选择两步法程序。

两步法程序（优先推荐）：

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	3 min	1
变性	98°C	10 sec	30-35
延伸	68°C	30 sec/kb	
终延伸	72°C	5 min	1

三步法程序（常规程序）：

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性 ¹	98°C	3 min	1
变性	98°C	10 sec	30-35
退火 ²	60°C	20 sec	
延伸 ³	72°C	30 sec/kb	1
终延伸	72°C	5 min	

【注】：

1. 预变性温度和时间：推荐温度：98°C，时间：3 min，高 GC 含量模板 5-10 min。
2. 退火温度和时间：推荐温度：60°C，也可根据需要，设立温度梯度去摸索引物退火的最适温度。推荐退火时间设置为 20 sec，可以在 10-30 sec 内调节。退火时间太长可能导致扩增产物在胶上呈弥散状。
3. 延伸温度和时间：推荐温度：72°C。时间：30 sec/kb，复杂模板根据实际情况可延长至 60 sec/kb。

梯度温度退火程序（难扩增基因推荐程序）：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	98°C	3 min	1
变性	98°C	10 sec	15, 每个 循环 降 低 1°C
梯度退火	70-55°C	20 sec	
延伸	72°C	30 sec/kb	
变性	98°C	10 sec	20
正常退火	55°C	20 sec	
延伸	72°C	30 sec/kb	
终延伸	72°C	5 min	1

*不同扩增程序下的特点：

程序类型	两步法	三步法	梯度退火
速度	最快	中等	慢
特异性	高	中等	高
PCR 产量	中等	最高	中等
检出率	高	中等	高