

GsmartI Pfu DNA Polymerase

浓度: 5U/ μ l

货号: GWP100

有效期: 24个月

保存条件: -20°C

产品组成	GWP100S	GWP100M	GWP100L
	500U	1000U	2500U
GsmartI Pfu DNA Polymerase	100 μ l	200 μ l	500 μ l
10X Pfu Buffer	1ml	1ml	2 x 1ml

产品简介

- GsmartI Pfu DNA Polymerase适用于很多重要的PCR反应, 该酶即使在困难的模板上也能精确快速的进行PCR扩增。GsmartI Pfu DNA Polymerase的高保真性使其成为克隆的最佳选择。该酶具有5'-3'聚合酶活性和3'-5'外切酶活性, 使PCR扩增产物产生平末端, 也可以在聚合反应中纠正错误参入的碱基, 具有较高的保真性; 该酶也适合扩增长的扩增子。
- 活性单位定义:
用活化的大马哈鱼精子DNA做模板, 74°C 30min内摄入10nmol全核苷酸为酸性不溶物的活性定义为一个活性单位, 即1U。

注意事项

1. 推荐退火温度为引物Tm值-5°C;
2. 延伸速度1-2kb/min;
3. 3.50ul体系中GsmartI Pfu DNA Polymerase的用量为2.5 U;
4. 使用dNTP, 请勿用dUTP;
5. GsmartI Pfu DNA Polymerase产生平末端DNA产物;

使用指导

打开前所有管子都需要轻轻混匀和离心以保证溶液的均一性和利用率, PCR 反应液应放置于冰上配制。如果扩增多个样本, 可以配制反应mix, 最后加入GsmartI Pfu DNA Polymerase。

1. 反应体系

成分	50 μ l	100 μ l
10x pfu Buffer	5 μ l	10 μ l
10mM dNTP	0.5 μ l	1 μ l
Forward primer* (20 μ M)	0.5 μ l	1 μ l
Reverse primer* (20 μ M)	0.5 μ l	1 μ l
模板DNA	X μ l	X μ l
GsmartI Pfu DNA Polymerase	0.5 μ l	1 μ l
灭菌水	补水至50 ul	补水至100 μ l

* 推荐的引物终浓度为0.2 μ M, 但可以根据需要在0.1-0.5 μ M范围内变化。

2. 涡旋混匀, 并简单离心

3. PCR反应程序

	50ul	50ul	100ul
预变性	95	4 min	1
变性	94	30 s	25-35
退火	X°C	30 s	25-35
延伸	72	Y	25-35
终延伸	72	5 min	1
保存	4	Hold	Hold

* 备注: 退火温度根据具体引物序列确定;

延伸温度以1-2kb/min计算;

反应混合物的组分

- **酶**:酶的最佳用量取决于模板的量和PCR产物的长度。一般50 μ l 反应体系中使用 2.5U的Gsmartl Pfu DNA Polymerase 就能得到较好的结果。
- **Buffers**:提供10x Pfu Buffer
- **dNTP**

Gsmartl Pfu DNA Polymerase 扩增需要高质量的dNTP, 4种dNTP中每种最佳浓度为100 μ M。Gsmartl Pfu DNA Polymerase 不能识别dUTP、dITP 或其衍生物, 故不能使用包含dUTP、dITP 及其类似物的模板和引物。
- **模板**:50 μ l 反应体系中, 低复杂度的模板DNA(比如质粒、 λ DNA和BAC DNA等)用量1 μ g-100 ng;高复杂度的基因组DNA模板用量为50-250ng, 如果cDNA 合成反应混合液, 模板体积不要超过PCR总反应体积的1/10。
- **DMSO(可选)**

对于高GC模板, 推荐的DMSO终浓度为3%;DMSO也可以用于超螺旋质粒的解旋和变性。如果反应体系中添加高浓度的DMSO, 要降低退火温度, 因为DMSO会影响引物的熔点。据报道10%DMSO可以使退火温度降低5.5-6.0 $^{\circ}$ C。

反应条件

- **起始变性温度**:变性温度为95 $^{\circ}$ C, 由于Gsmartl Pfu DNA Polymerase 具有较高的热稳定性, 可以使用更高的变性温度。95 $^{\circ}$ C 起始变性温度下变性时间推荐使用4 min, 有些模板推荐使用更长的变性时间, 变性时间可以延伸至5 min。
- **变性温度**:对大多数模板来说, 94 $^{\circ}$ C下变性30s已经足够。
- **引物退火**:引物 T_m -5 $^{\circ}$ C 退火10-30 s。
- **延伸**:延伸在72 $^{\circ}$ C 下进行, 延伸时间依赖于扩增子的程度和复杂度, 对于低复杂度的基因组DNA, 延伸速度为15-30 s/kb;对于高难度的基因组DNA 延伸速度为30-60 s/kb;对于cDNA 模板, 若想获得比较理想的结果, 延伸速度为30-60 s/kb。

引物设计

- 引物3'端最后一个碱基最好是G或C
- 引物3'端最后几个碱基避免出现连续错配
- 引物3'端避免有发夹结构
- 正向引物和反引物的Tm值不要相差太大, Tm值应控制在55-65°C
- 引物的GC含量控制在40%-60%之间
- 引物A、T、C、G应均匀分布, 避免使用GC或TA含量高的区域

可能会遇到的问题及解决办法

- 无扩增产物或扩增效率低
 - a) 不要使用包含dUTP和dITP的引物
 - b) 样本浓度低, 增加模板量
 - c) 可能模板DNA降解, 使用高质量的模板
 - d) 增加延伸时间
 - e) 增加循环数
 - f) 优化退火温度
 - g) 优化酶用量
- 出现非特异性扩增或smear带
 - a) 减少酶用量
 - b) 缩短延伸时间
 - c) 减少循环数
 - d) 降低引物浓度