

pfu DNA Polymerase

浓度: 2.5 U/μl

产品规格	pfu DNA polymerase	10× pfu Buffer
PT201-02	500 U	1 ml
PT201-03	1000U	1 ml×2

● 储存条件

pfu DNA Polymerase -20°C长期保存。

10× pfu Buffer -20°C长期保存; 如果长期储存于4°C会析出沉淀, 使用前混合均匀, 不影响使用效果。

上海莱枫生物科技有限公司

www.lifefeng.com

电话: 021-64810180 传真: 021-54252754

技术支持: 13817902990(上海)

● 产品简介

pfu DNA Polymerase是从含*Pyrococcus furiosus* DNA Polymerase基因的重组*E.coli*菌株中分离纯化的热稳定蛋白, 分子量约90 KD。具有5'→3'聚合酶活性和3'→5'外切酶活性, 能切除延伸过程中嵌入的错配碱基。

pfu DNA Polymerase是目前已发现的耐热DNA聚合酶中保真性最高的一种。其PCR产物为平末端, 可直接连接到平末端克隆载体, 或者末端加A处理后再与TA载体连接。

● 单位定义

74°C, 30 min, 使10 nmol dNTP掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量定义为1个活性单位。

活性检测条件: 50mM Tris-HCl (pH 9.0, 25°C), 50mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.2mM each dNTPs(包括[3H]-dTTP), 200 μg/ml活化的小牛胸腺DNA和0.1 mg/ml BSA。

● 酶储存缓冲液

20 mM Tris-HCl (pH 8.2), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% NP-40, 0.4%BSA和 50%(v/v) 甘油。

● 10× pfu Buffer

优化的PCR Buffer使PCR具有更高的灵敏度和特异性, 并且无需调节Mg²⁺浓度

10× pfu Buffer含KCl, (NH₄)₂SO₄, 20mM MgSO₄, Tris-HCl, pH 8.8(25°C), 0.5% Tween 20和常规PCR增强剂。

● 质量控制

SDS-PAGE检测纯度大于99%; 经检测无外源核酸酶活性, PCR方法检测无宿主DNA残留, 能有效扩增人类基因组中的单拷贝基因。

● 使用方法

PCR体积

最大PCR体积不能超过变温金属模块上横截面, 比如常见的PCR仪和0.2 ml PCR管最大体积为80 μl。

最佳PCR体积与PCR仪和PCR管有关。为保证PCR过程有效升降温, PCR体积应尽可能缩小, 但同时需要考虑高温过程水分蒸发的问题, 常见的PCR仪和0.2 ml PCR管最佳体积为25-50 μl。

1. PCR成分准备

将10× pfu Buffer, dNTPs, 模板DNA和引物室温解冻后置于一冰上。**10× pfu Buffer解冻后需充分混合均匀。**

2. PCR反应液配制(以50 μl PCR体系为例)

在冰上将以下各成分加入PCR反应管:

模板DNA	*
Primer1 (10 μM)	1 μl
Primer2 (10 μM)	1 μl
dNTPs (10 mM each)	1 μl
10× pfu Buffer	5 μl
pfu DNA Polymerase	1 μl
dH ₂ O	补充至50 μl

* 请参考● PCR体系成分△模板DNA用量。

注意: 尽可能使用合适精确度的加样器, 并且避免加样体积小于1 μl (可适当比例稀释后加样)。

3. 手指轻弹PCR反应管充分混匀, 简短离心。

4. PCR反应循环设置举例

94°C	3 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
55°C※	30 sec	
72°C	2 min §	
72°C	5 min	

4°C soak

※以实际最佳退火温度为准。

§以0.5 kb/min计算。

● PCR体系成分

△模板DNA的纯度

很多残留的核酸提取试剂会影响PCR反应, 包括蛋白酶、蛋白变性剂(比如SDS、胍盐、苯酚)、高浓度盐(KAc、NaAc、辛酸钠等)和高浓度EDTA等。这些杂质可通过乙醇或异丙醇沉淀后用66-70%乙醇洗涤两次去除, 大部分商品化的核酸纯化试剂盒可有效去除这些杂质。

磷酸盐能螯合Mg²⁺, DNA提取和纯化过程中很难彻底去除, 因此不推荐使用PBS等磷酸盐缓冲液作为模板DNA提取试剂。

来源于样品的难以去除的PCR抑制剂, 包括肝素、腐植酸、植物酸性多糖等, 应使用合适的提取和纯化方法。

高纯度、高浓度的DNA作为PCR模板是最理想的。高浓度DNA可通过稀释减少干扰PCR的成分。

cDNA作为模板时, 应考虑模板中高浓度盐离子(尤其是缓冲体系和游离Mg²⁺), 一般不超过PCR体积的10%。

关于模板DNA溶解或者洗脱使用去离子水或者TE:

去离子水为弱酸性, 不利于DNA的洗脱, 也不利于DNA的稳定保存。

TE常见的组成成分为: 10 mM Tris, pH 8.0(25°C), 0.1 mM EDTA, 有利于DNA的长期稳定保存, 其中EDTA能螯合Mg²⁺, 通常模板用量不超过PCR体积的20%, 不用考虑EDTA对PCR的干扰。如果模板用量占PCR体积比例较大, 建议将TE稀释10倍后溶解或者洗脱DNA。

△模板DNA用量

为保证反应的效率和特异性, 模板DNA终浓度应小于10 ng/μl。引物与模板DNA(尤其是低拷贝模板)有很多非特异性结合位点, 不一定会产生非特异性扩增产物, 但在PCR初期会大量消耗引物, 因此降低PCR效率。

PCR产物作为模板, 包括二次PCR和重叠PCR, 不存在引物与模板的非特异性结合大量消耗有效引物的情况, 因此PCR效率非常高, 需大比例稀释后作为模板, 并且需要严格控制循环数。

微量量的样品可以作为PCR模板, 但**为了保证反应的灵敏度, 25 μl体系使用10⁴拷贝的靶序列作为模板:** 可参考表1计算需加入PCR体系的模板量。

表1: 1 μg各种来源的DNA对应的摩尔数

1 μg DNA	mol
1 kb线性双链DNA	9.18 × 10 ¹¹
3 kb质粒DNA	2.9 × 10 ¹⁰

Lambda (λ) DNA	1.9 × 10 ¹⁰
<i>E.coli</i> 基因组DNA	2.0 × 10 ⁸
人类基因组DNA	3.0 × 10 ⁵

例如: 纯化的人类基因组DNA浓度为1 μg/μl, 某基因在人类基因组中拷贝数为10, 其单位体积拷贝数为:

$$3.0 \times 10^5 \text{ mol}/\mu\text{g} \times 1 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 10 \text{ copy/mol} = 3.0 \times 10^6 \text{ copy}/\mu\text{l}$$

$$1 \times 10^4 \text{ copy}/(3.0 \times 10^6 \text{ copy}/\mu\text{l}) = 1/300 \mu\text{l}$$

即: 1/300 μl浓度为1 μg/μl的人类基因组DNA(3.3 ng)中含10⁴拷贝该基因, 稀释300倍后加1 μl至25 μl PCR体系。

表2: 25 μl PCR体系特定模板用量

特定模板	25μl PCR体系用量
cDNA	<2.5 μl (<10%PCR体系体积)
PCR产物	用TE # 稀释100~10000倍后, 1 μl
菌液	直接使用1 μl菌液
菌落	枪头接触菌落, 在PCR管中吹打数次

△引物浓度

一般每条引物配制的浓度为10 μM(50×), 工作浓度为0.2 μM。引物过量可能会出现非特异性扩增, 引物过少可能会降低扩增效率。

△dNTPs

dNTPs应少量分装, 减少反复冻融。需特别注意dCTP会缓慢水解为dUTP, 后者是pfu酶的抑制剂。dNTPs反复冻融和过多循环数(高温条件)都会加剧dCTP水解。

常规PCR中dNTPs使用终浓度为0.2 mM(each), 浓度过低会减少PCR产物的产量; 浓度过高会因dNTP上的磷酸根螯合Mg²⁺降低游离Mg²⁺浓度而抑制PCR, 如需调整dNTPs浓度, 需同时调整Mg²⁺, 使游离Mg²⁺为0.7 mM。

● PCR参数设置

△预变性

通常预变性温度为95°C, 预变性时间请参考下表:

表3: 各种模板建议使用的预变性时间

模板种类	预变性时间
直接PCR(比如菌液、毛囊)	10-15 min
超螺旋质粒DNA	5-10 min
基因组DNA	3-5 min
cDNA或者PCR产物	10秒

变性温度过高或时间过长会造成模板DNA的断裂和水解, 降低PCR效率。

△退火温度: PCR的关键参数

初次使用一对引物时可尝试低于Tm 5°C作为退火温度(如果两条引物Tm不同, 参考较低的Tm)。

使用oligo软件计算引物的Td值,以低于Td值4°C作为退火温度。Td值的计算方法考虑了引物邻近碱基组成和引物3'末端与模板配对的稳定性,因此更具有参考意义。

退火温度偏高不利于引物与模板的结合,会降低PCR效率。退火温度偏低,会增加引物之间、引物与模板的非特异性结合,降低了引物与模板特异性结合的概率,从而降低了PCR效率,最不利的情况是产生大量引物二聚体和非特异性扩增。

最佳退火温度需要进行梯度PCR确定。

如果最佳退火温度为68°C-78°C,可以省略延伸步骤,即合并退火和延伸步骤。

△延伸

延伸温度通常为72°C,延伸时间以0.5 kb/min计算,时间过长可能会增加非特异性扩增。延伸时间过短,相对有利于引物二聚体的扩增。

循环结束后,继续延伸5~10 min,以获得完整的双链产物。

△循环数:非常重要的PCR参数,切勿盲目引用文献参数。循环数过多可能会减少目的产物。PCR过程中不完全延伸和高温断裂,会缓慢积累随机3'末端。产生大量PCR产物后,引物被大量消耗,PCR产物3'末端和随机3'末端与变性模板的非特异性结合相对占优势,出现了随机扩增;dNTP大量消耗导致游离Mg²⁺浓度增高,也加剧了随机扩增。随机扩增产物电泳为涂抹带,随着循环数的增加随机扩增产物长度会不断延长,甚至电泳时积累在加样孔,而目的PCR产物会逐渐减少,甚至消失。

循环数过多会产生大量气溶胶,可能会污染同次PCR其他反应管,造成假阳性。例如单独做空白对照无目的产物,而与阳性样品平行PCR时,空白对照出现了目的产物。

莱枫PCR系列产品PCR效率通常会高于其他公司同类产品,应特别注意控制循环数,建议参考表4使用合适的循环数。

最佳循环数与模板DNA种类、拷贝数、纯度和加样量,退火温度,PCR试剂等各种因素有关。

摸索最佳循环数:配制大体积PCR体系,分装到3-5个PCR反应管,使用较低的循环数取出一管(例如,PCR产物为模板进行10个循环),预变性时间设为10秒,再进行3-5个循环,以此类推,最后平行电泳。

表4: 各种模板建议使用的循环数

模板种类	循环数
1. PCR产物	10-20
2. 质粒DNA	15-25
3. 菌液、菌落PCR克隆鉴定	20-25
4. 高拷贝模板	15-20
5. 多拷贝模板	15-25
6. 低拷贝模板	25-35
7. 痕量模板	30-40

1. PCR产物: 二次PCR或者重叠PCR。
2. 质粒DNA: 通用引物建议使用15-25个循环,如扩增高GC区需增加循环数。
3. 菌液、菌落: 通用引物建议使用20-25个循环。
4. 高拷贝模板: 基因组上高度重复序列,几百-几百万个拷贝,例如真核生物rRNA和某些tRNA基因。
5. 多拷贝模板: 基因组上轻度和中度重复序列,例如真核生物actin、gloubin等内参基因,原核生物rRNA和某些tRNA基因; 高丰度mRNA逆转录产物,例如actin、gloubin等内参基因。
6. 低拷贝模板: 基因组上单一序列,大部分功能基因为单拷贝。低丰度mRNA逆转录产物。
7. 痕量模板: 模板总量为ng级或更低; 因断裂或降解导致有效模板量少,比如血浆游离DNA、石蜡包埋组织中单拷贝基因。

●提高PCR特异性的方法

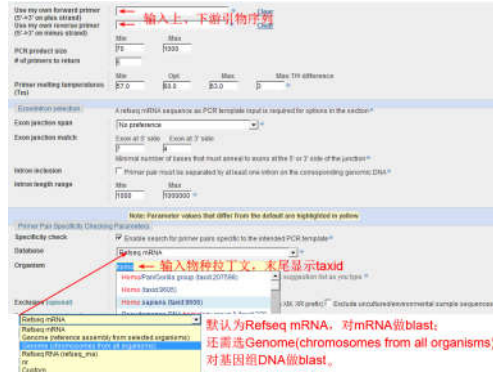
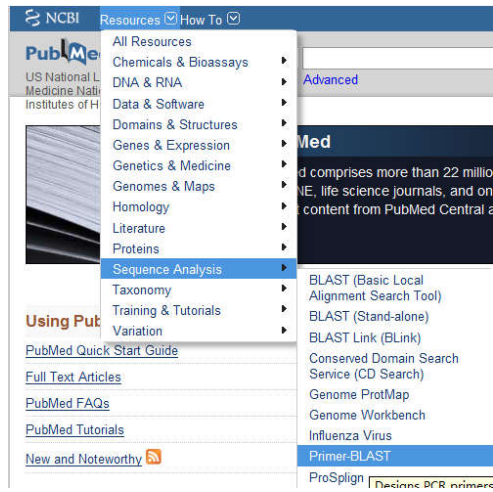
△使用适量的模板DNA

模板量偏多或者偏少都可能产生非特异性扩增,请参考●PCR体系成分△模板DNA用量。

△Blast

对引物进行Blast验证是非常有必要的,有时候非特异性扩增是因为引物设计不合理造成的。

cDNA除了对mRNA Blast之外,还需要对Gemome做Blast,没有任何RNA提取和纯化方法能彻底去除DNA,非特异性扩增也可能是来自基因组DNA。



△递减PCR(Touch Down PCR)

PCR起始的几个循环使用严紧的退火条件。虽然扩增效率低,但靶序列特异性最高,被优先扩增,其产物在后续循环中继续占优势,从而提高特异性。退火温度从高于Tm(或者Td) 5°C开始,每个循环递减,直到低于Tm(或者Td) 5°C; 一般用10个循环,每个循环降低1°C。之后用低于Tm(或者Td) 5°C作为退火温度,再进行15-25个循环。

△巢式PCR(Nested PCR)

用两对引物进行两次PCR。第一对引物(外引物)从多个靶位点扩增产生特异性和非特异性产物。第二对引物(巢式引物)位于第一对引物内侧,只能与第一次PCR产生的特异性产物互补(因为同时能与两对引物互补的非特异序列极少)。即: 第一次PCR产生的特异性产物在第二次PCR中占绝对优势被扩增。

●常规PCR污染和防治

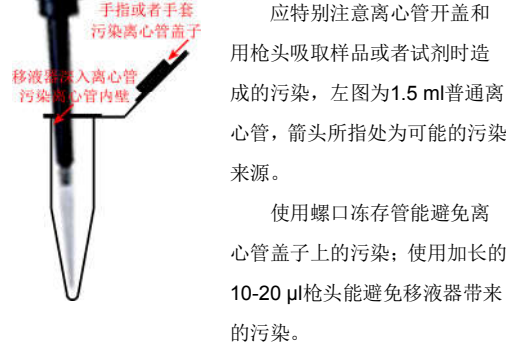
1. 气溶胶污染

PCR过程中会产生气溶胶,即PCR产物从PCR管中蒸发污染同次PCR的其他反应管、PCR仪和局部空间。如果PCR仪盖热效果差、PCR管盖子密封性差或者PCR管在高温时变形,气溶胶污染会更严重。

使用合适的循环数能避免同次PCR产生的气溶胶污染其他反应管,例如某些高拷贝模板使用20个循环目的产物已经足够多,空白对照和阴性样品未出现目的产物,而使用30个循环目的产物的量没有明显的变化或者反而减少,而空白对照和阴性样品出现目的产物(假阳性)。使用同一种引物在同一台PCR仪连续进行PCR,上一次PCR残留的气溶胶容易污染下一次PCR样品。**高温条件下DNA会断裂和水解,以此可以消除PCR仪内气溶胶污染**; 使用不同的引物交叉进行PCR,或将PCR仪空运行95-100°C半小时,再进行PCR。

吸取PCR产物的移液器中有大量气溶胶污染,因此配制PCR体系与PCR产物电泳需分别使用专用的移液器。气溶胶也可能存在于PCR仪周围或电泳槽附近,因此尽可能将PCR样品准备场所远离PCR仪和电泳槽。

2. 不良操作习惯造成的污染



3. 加样器、实验器材和容器等去除污染的方法
 - A. 1%盐酸或者次氯酸浸泡半小时以上,尤其是次氯酸的氧化性也会使DNA断裂。适合处理手术剪、刀片、玻璃和塑料容器等。
原理: DNA在酸性环境中水解、脱嘌呤
 - B. 湿热高压。移液器和塑料器材需询问厂家能否高压。酒精灯炙烤。适合处理手术剪和刀片。
原理: DNA在高温条件下水解、断裂
 - C. 紫外照射。去除DNA污染不彻底,但适合处理房间或者操作台等空间场所。
原理: 紫外照射下DNA形成嘧啶二聚体