

## 產品資料

產品名稱：*Pfu* DNA Polymerase

產品代碼：102-9012-90-2

版本編號：971003

簡介：*Pfu* 核酸聚合酶是從高溫嗜熱菌 *Pyrococcus furiosus* 分離出的高準度(High Fidelity)耐熱性核酸聚合酶。*Pfu* 核酸聚合酶能校正 DNA 在 PCR 過程中產生的錯誤，而傳統的耐熱性核酸聚合酶 *Taq*、*Tth*，及它們的相關產品如 *AmpiTaq* 與 *KlenTaq* 等，都無法更正錯誤。耐熱性核酸聚合酶 *Vent*、*Deep Vent*、*Tli*、*Pwo*、*Pfu* 與 *Ultma* 等都具有校正功能(Proof reading)，但 *Pfu* 核酸聚合酶是目前已發現的所有耐熱性核酸聚合酶中擴增 DNA 時錯誤率(Error Rate)最低的產品。*Pfu* 之錯誤率比 *Taq* 及相關產品低 10 倍，比 *Vent* 和 *Pwo* 低 2-4 倍，比 *Ultma* 低 30 倍。如將其它的耐熱性核酸聚合酶與 *Pfu* 核酸聚合酶混合使用可以降低產品的錯誤率，但準確度不如單獨使用 *Pfu* 核酸聚合酶。在基因選殖、基因表達及基因突變分析等分子生物實驗操作中，由於對 DNA 擴增產物的正確率要求較高，常常希望萬無一失，*Pfu* 是公認取代 *Taq* 的最佳選擇。

濃度：5U/uL

錯誤率： $10^{-6}$

10X 反應液：  
100mM KCl  
160mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
20mM MgSO<sub>4</sub>  
200mM Tris-HCl(pH8.8)  
1% Triton X-100  
1mg/mL BSA

品質管制：

1. 無外來核酸酶活性。
2. SDS-PAGE 純度大於 95%。
3. 以 PCR 方法檢測無外來 DNA。
4. 能自 100ng 的 *Lambda* 模板中特异性擴增出 1Kb 及 2Kb 之單套 (Single Copy) 基因。

**保存液：** 50mM Tris-HCl(pH8.2)  
0.1mM EDTA  
0.1% Tween20  
0.1% NP-40  
1mM DTT  
50% Glycerol

**保存條件：** -20°C

**參考資料：** *Pfu* 核酸聚合酶來源為高溫嗜熱菌 *Pyrococcus furiosus*，分子量為 90KD。以 *Pfu* 核酸聚合酶擴增得到的 PCR 產物兩端為平端(Blunt End)，3'端無 A 鹼基突出。*Pfu* 核酸聚合酶有 3'端向 5'端之外切酶活性(錯誤校正功能)，無 5'端向 3'端之外切酶活性。聚合時延伸速度為每分鐘 600 鹼基，最佳溫度為 65-75°C，dNTP 工作濃度為 100-300uM，最佳鎂離子濃度為 2-3mM，最佳 pH 為 8.1-9.1。

**使用方法：** *Pfu* 的使用方法與 *Taq* 相同，50uL 標準反應液中約需 *Pfu* 核酸聚合酶 2.5U 左右。

**注意事項：**

1. *Pfu* 擴增效率通常比 *Taq* 為低，主因為 *Pfu* 核酸聚合酶具有 3'端向 5'端之外切酶活性(錯誤校正功能)，並非 *Pfu* 核酸聚合酶品質不穩定。*Pfu* 在擴增 2Kb 以下的 DNA 片段時，與 *Taq* 差別不大。
2. 10X 反應液中已含有鎂離子，使用該反應液能確保擴增產物的正確性。提高反應液的 pH 與鎂離子濃度能提高擴增的產率，但產物的正確性將會下降。一般不建議以 *Taq* 反應液代替 *Pfu* 反應液進行高準度 DNA 擴增反應。
3. 使用 *Pfu* 核酸聚合酶進行擴增反應時，引子純度要求較高，長度必須大於 18 個鹼基，Tm 值介於 55 至 80°C 間，引子濃度則在 0.1 至 0.5uM 之間，比 *Taq* 略高。*Pfu* 核酸聚合酶具有 3'端向 5'端之外切酶活性(錯誤校正功能)，可能會分解引子，特別是在溶液中沒有 dNTP 時。因此，*Pfu* 核酸聚合酶必須最後加入反應體系中，並於加入後立即進行擴增反應。
4. *Pfu* 的熱穩定性比 *Taq* 略高，對於 GC 含量高的模版，關鍵溫度提高到 98°C 亦不會影響 *Pfu* 核酸聚合酶的活性。
5. 以 *Pfu* 核酸聚合酶擴增之 PCR 產物兩端為平端(Blunt End)，無 3'端 A 鹼基突出，不能直接進行 TA 選殖，必須使用加 A(A-Tailing)套件處理後，方可進行 TA 選殖。