



0 2 5 - 8 5 6 5 3 5 2 5

www.atgbiotechnology.com

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室

Proofast[®] Super-Fidelity DNA Polymerase

P201



产品说明书
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

目录 Product Manual

产品简介	1
产品组成	1
储存条件	1
单位定义	1
质量控制	2
实验方案	2
引物设计注意事项	4

产品简介

Proofast[®] Super-Fidelity DNA Polymerase 是一种基于 Pfu DNA Polymerase 改造而成的新一代超保真 DNA 聚合酶，具有极高的扩增效率和广泛的模板适应性，可用于几乎所有 PCR 反应。经过对 Pfu DNA Polymerase 的分子酶学改造和结构模块组装，Proofast[®] Super-Fidelity DNA Polymerase 的行进性、耐热性和保真性都得到了大幅度提升，即使是非常复杂的模板，也能准确快速的完成反应。其保真度是普通 Taq 酶的 52 倍，是 Pfu 酶的 6 倍；酶液中添加了独特的延伸因子，扩增速度可以达到 15 sec/kb。高保真性以及卓越的扩增效率使得 Proofast[®] Super-Fidelity DNA Polymerase 成为高保真 PCR 的首选用酶。Proofast[®] Super-Fidelity DNA Polymerase 具有 5'-3'聚合酶活性和 3'-5'外切酶活性，扩增产物为平端，适用于本公司 CloneUFO[®]快速克隆试剂盒。

5 × Proofast[®] SF 反应缓冲液对于简单或复杂模板、短片段或长片段 PCR 扩增都具有良好的适应性。缓冲液中已经含有 10 mM Mg²⁺ (1 × 终浓度为 2 mM)，可以使用 DMSO 或 MgSO₄ 对反应体系进行优化。附带的 PCR Enhancer 可有助于高 GC 含量片段的扩增。

产品组成

组 分	P201 (10 U)	P201 (100 U)	P201 (500 U)
5 × PSF Buffer (Mg ²⁺ Plus)	100 μl	1 ml	5 × 1 ml
Proofast [®] Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μl)	10 μl	100 μl	500 μl
dNTP (10 mM each)	/	150 μl	600 μl
25 mM MgSO ₄	/	100 μl	500 μl
5 × PCR Enhancer	/	200 μl	1 ml
6 × Loading buffer	/	1 ml	1 ml
DMSO	/	200 μl	1 ml

储存条件

-20°C 保存，于 -20 ~ 0°C 运输。▲ 避免反复冻融。

单位定义

用活性化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，74°C 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 个活性单位 (U)。

质量控制

核酸外切酶残留检测：20 U 本品和 0.6 μg λ-Hind III 在 74°C 下孵育 1 h，DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测：20 μl 反应体系，10 U 本品和 1 μg λDNA，37°C 温育 4 h，DNA 的电泳谱带无变化。

RNase 残留检测：20 U 本品和 1 μg HeLa 细胞总 RNA 在 37°C 下孵育 30 min，RNA 的电泳谱带不发生变化。

大肠杆菌残留 DNA 残留检测：50 μ l 体系中，以 ddH₂O 为模板，扩增 *E. coli* 16 s rDNA 基因。30 个循环后进行 1%琼脂糖凝胶电泳，染色，无扩增条带。

功能检测：以 10 ng λ DNA 为模板扩增 30 个循环，1%琼脂糖凝胶电泳，染色，可见各自单一的目的条带。

实验方案

1. 反应体系 (推荐冰上配制):

组分	用量
ddH ₂ O	to 50 μ l
5 \times PSF Buffer (with 10 mM MgSO ₄)	10 μ l
25 mM MgSO ₄ * ¹	optional
dNTPs (10 mM each)* ²	1 μ l
DMSO* ³	optional
5 \times PCR Enhancer* ⁴	optional
模板 DNA* ⁵	optional
引物 1 (10 μ M)	2 μ l
引物 2 (10 μ M)	2 μ l
Proofast [®] Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/ μ l)* ⁶	1 μ l

*1 体系终浓度为 2 mM。如有特殊需要，可用 25 mM MgSO₄，以 0.2 ~ 0.5 mM 为间隔向上摸索。

*2 请勿使用 dUTP 和带有尿嘧啶的引物或模板。

*3 扩增子 GC 含量>60%时，在体系中加入终浓度为 3%的 DMSO 可能有利于扩增。

*4 推荐仅当扩增子 GC 含量>60%且优化条件也无法正常扩增时使用；可能会降低保真度。

*5 不同模板最佳反应浓度有所不同，下表为 50 μ L 反应体系推荐模板使用量：

模板种类/扩增长度	< 1 kb	1 kb ~ 10 kb	> 10 kb
基因组 DNA	50 ng ~ 250 ng	100 ng ~ 300 ng	150 ng ~ 400 ng
质粒或病毒 DNA	10 pg ~ 20 ng	10 pg ~ 20 ng	1 ng ~ 30 ng
cDNA	1 ~ 5 μ l (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)		

*6 推荐使用 1 U/50 μ l。可以在 0.5 ~ 2 U/50 μ l 之间进行优化，请勿超过 2 U/50 μ l。为了防止聚合酶因 3'→5'外切酶活性降解引物，建议将聚合酶在最后一步加到反应体系中。

2. 一般 PCR 反应条件设置：

步骤	温度	时间	阶段	循环数
预变性 ^{*1}	95°C	30 sec ~ 3 min	Stage 1	Reps: 1
变性 ^{*2}	95°C	5 ~ 10 sec		
退火 ^{*3}	45°C ~ 72°C	10 ~ 30 sec	Stage 2	Reps: 25 ~ 35
延伸 ^{*4}	72°C	15 ~ 30 sec/kb		
彻底延伸	72°C	5 ~ 10 min	Stage 3	Reps: 1

*1 推荐大多数模板的预变性温度为 95°C，时间为：质粒或病毒 DNA 30 sec，基因组 2 min，cDNA 3 min；对于高 GC 含量模板，预变性温度需提升至 98°C，变性时间为 2 ~ 4 min；对于超过 10 kb 的扩增子，预变性温度需降低至 92°C，变性时间不超过 2 min。

*2 对于大多数模板在 95°C 变性时间设为 5 ~ 10 sec 即可。对于高 GC 含量模板，变性温度需提升至 98°C；对于超过 10 kb 的扩增子，变性温度需降低至 92°C，并延长变性时间至 15 sec。

*3 Proofast[®] Super-Fidelity DNA Polymerase 能够促进模板和引物高效退火。一般来说，退火温度设置为引物 T_m 值±3°C 范围之内即可。如果需要，可以建立一个温度梯度反应去寻找引物模板结合的最适温度。退火时间太长可能导致扩增产物在胶上呈现弥散状。因此，推荐退火时间设置为 10 sec 即可。对于一些困难模板，退火时间可在 10 ~ 30 sec 之间调整。

*4 对于大多数扩增反应，延伸过程可在 72°C 进行。对于超过 10 kb 的扩增片段，需降低延伸温度至 68°C。延伸时间取决于扩增片段的长度和模板的复杂性。使用质粒等复杂程度较低的 DNA 做模板时，可使用 15 sec/kb 的延伸时间；使用基因组，cDNA 等复杂程度较高的 DNA 做模板时，延伸时间应为 30 sec/kb。太长的延伸时间会导致非特异性扩增增加，因此延伸时间请勿超过 30 sec/kb。

3. 长片段 PCR 指南：

*使用高质量的模板；

*使用长引物。将引物加长至 T_m 值 68 ~ 72°C，把退火/延伸温度合并为 68°C。这样可以显著提高扩增特异性；

*适当提高 Proofast[®] 酶量，但 50 μl 反应体系内不要超过 2 U；

*添加 DMSO，以 1% 的浓度递增，调整范围为 0% ~ 6%；

*推荐反应条件设置：

步骤	温度	时间	阶段	循环数
预变性	92°C	2 min	Stage 1	Reps: 1
变性	92°C	5 ~ 15 sec		
延伸	68°C	15 ~ 30 sec/kb	Stage 2	Reps: 25 ~ 35
彻底延伸	68°C	5 ~ 10 min	Stage 3	Reps: 1

4. 高 GC 含量模板 PCR 指南：

*使用高质量的模板；

*提高变性温度至 98°C；

*添加 DMSO，以 1% 的浓度递增，调整范围为 0%~8%；

*添加 5 × PCR Enhancer；

*推荐反应条件设置：

步骤	温度	时间	阶段	循环数
预变性	98°C	3 min	Stage 1	Reps: 1
变性	98°C	10 sec		
退火	45°C~72°C	10~30 sec	Stage 2	Reps: 25~35
延伸	72°C	15~30 sec/kb		
彻底延伸	72°C	5~10 min	Stage 3	Reps: 1

引物设计注意事项

引物 3' 端最后一个碱基选择 C 或 G；

引物 3' 端最后 8 个碱基应避免出现连续错配；

引物 3' 端尽量避免出现发夹结构；

引物 T_m 值控制在 55°C ~ 65°C 之间；

引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物 T_m 值计算；

引物 GC 含量控制在 40%~60% 之间；

正向引物和反向引物 T_m 值以及 GC 含量尽可能一致。