



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 D 6 幢 710 室

Proofast[®] HS Super-Fidelity DNA Polymerase

P204

Version 23.1.1



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
产品组分.....	1
保存条件.....	1
单位定义.....	1
质量控制.....	2
实验方案.....	2
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 90 倍，是 Pfu 酶的 10 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[®] HS Super-Fidelity DNA Polymerase 中添加了在常温下能够抑制 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'外切酶活性的单克隆抗体，可进行高特异性的热启动(Hot Start)PCR。Proofast[®] HS 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。

产品组分

组分	P204 (100 U)	P204 (500 U)	P204 (1,000 U)
5 × PHSF Buffer (with 10 mM MgSO ₄)	1 ml	5 × 1 ml	
dNTP Mix (10 mM each)	100 μl	500 μl	
Proofast [®] HS Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μl)	100 μl	500 μl	2 × 500 U
5 × PCR Enhancer	500 μl	3 × 1 ml	
6 × DNA Loading buffer	1 ml	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 -HindIII 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 λ DNA，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 μl 体系中，以 ddH₂O 为模板，扩增 *E.coli* 16s 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 μl
5 \times PHSF Buffer (with 10 mM MgSO ₄)	10 μl
25 mM MgSO ₄ *1	optional
dNTP Mix (10 mM each) *2	1 μl
DMSO *3	optional
5 \times PCR Enhancer *4	optional
引物 1 (10 μM)	2 μl
引物 2 (10 μM)	2 μl
模板 DNA *5	optional
Proofast [®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase *6	1 μl

*1 体系终浓度为 1.5 mM。如有特殊需要，可用 50 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 μl 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 μl (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)		

*6 推荐使用 1 U/50 μl 。可以在 0.5-2 U/50 μl 之间进行优化，请勿超过 2 U/50 μl 。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。

* Proofast® HS Super-Fidelity DNA Polymerase 具有较强的校对活性。如扩增产物需要进行 TA 克隆，加 A 之前必须进行 DNA 纯化。

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	Rep: 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 min ~ 10 min	Stage 3	Rep: 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 Tm 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 Tm 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 ul 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	Rep: 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 min ~ 10 min	Stage 6	Rep: 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*1	98°C	30 sec ~ 3 min	Stage 1	Rep: 1
变性*2	98°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 min ~ 10 min	Stage 3	Rep: 1

5. 粗品扩增指南:

Proofast® Max Super-Fidelity DNA Polymerase 对许多 PCR 抑制剂具有良好的抵抗能力, 可用于细菌、真菌、植物组织、动物组织或全血样品的直接 PCR。下表为已成功扩增的粗品列表:

样品类型	扩增方式	推荐操作方式 (50 µl 体系)
全血	直接扩增	吸取 1-5 µl 作为扩增模板
滤干血清	直接扩增	剪取 1-2 mm ² 滤纸作为扩增模板
培养细胞	直接扩增	取少量细胞作为扩增模板
酵母	直接扩增	挑取单克隆或 1 µl 菌液作为扩增模板
细菌	直接扩增	挑取单克隆或 1 µl 菌液作为扩增模板
霉菌	直接扩增	挑取少量作为扩增模板
精液	直接扩增	挑取少量作为扩增模板
浮游生物	直接扩增	挑取少量作为扩增模板
植物组织	直接扩增	剪取 1-2 mm ² 组织作为扩增模板
小鼠尾巴	裂解后吸取裂解液扩增	吸取 1-5 µl 裂解液作为扩增模板
食品	裂解后吸取裂解液扩增	吸取 1-5 µl 裂解液作为扩增模板

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, GC 含量控制在 40%-60% 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;
- 正向引物和反向引物 T_m 值以及 GC 含量尽可能一致。