



Protein Biotechnologies

ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase

货号：PR304



Protein Biotechnologies

ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase

货号：PC304

北京普鲁顿生物科技有限公司 Protein Biotechnology Co., Ltd



Protein Biotechnologies

Protein Biotechnology Co., Ltd

免费咨询热线：400-999-4431

网站：www.proteinbiotechnology.com

销售：sales@proteinbiotechnology.com

市场：admin@proteinbiotechnology.com

技术：support@proteinbiotechnology.com

- ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase
- 目录号 PC304
- 使用手册
- 实验室使用，仅用于体外



产品描述

ProMan™ 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 的基因工程改造，ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase 的行进性得到了大幅度提升，即使是非常复杂的模板，也能准确快速的完成反应。其错配率是普通 Taq 酶的 1/52，是 Pfu 酶的 1/6；且扩增速度可以达到 15 秒/kb。高保真性以及卓越的扩增效率使得 ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase 成为高保真 PCR 的首选用酶。ProMan™ 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，并适用于 ClonMan™ 快速克隆试剂盒 (PN101/PN111/PN112 等)。5 × ProMan 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)，可以使用随酶提供的 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。

产品应用

用于 DNA 的高保真扩增，如基因表达克隆、基因定点突变、细胞内基因点突变分析 (SNP) 和平末端补平等几乎所有 PCR 反应。

产品组成

组份	PC304-01 100U	PC304-02 500U	PC304-03 1000U
5 × SF Buffer (with 10 mM MgSO ₄)	1.25 ml		
25 mM MgSO ₄	1 ml		
dNTP Mix (10 mM each)	100 μl		
ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μl)	100 μl		
5 × PCR Enhancer	500 μl		
DMSO	100 μl		
10 × Loading buffer	1.25 ml	PC304-01×5	PC304-01×10

产品储存

-20°C 保存。

单位定义

用活化的大马哈鱼精子 DNA 作为模板/引物，74°C 30 分钟内，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: 10 U 的本酶和 0.6 μg λ-Hind III 在 74°C 下孵育 1 小时, DNA 的电泳谱带不发生变化。

核酸内切酶残留检测: 10 U 的本酶和 0.6 μg Supercoiled pBR322 DNA 在 74°C 下孵育 1 小时, DNA 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, 加入 2 U 本酶, 以 ddH₂O 为模板, 扩增 E. coli 16 s Rdna 基因。35 个循环后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 无扩增条带。

功能检测 1: 50 μl PCR 体系中加入 1 U 本酶, 以 100 ng 人基因组 DNA 为模板扩增 α-1-antitrypsin gene。30 个循环后将 1/10 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 可见有单一的 8.2 kb 条带。

功能检测 2: 50 μl PCR 体系中加入 1 U 本酶, 以 10 ng λDNA 为模板扩增 30 个循环, 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 可见有单一的 15 kb 条带。

应用实例

1. 反应体系配置

所有操作请在冰上进行, 各组分解冻后请充分摇匀。为了防止 ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase 的校对活性降解引物, 请将聚合酶最后加入反应体系中。各组分使用完毕后及时放回 -20°C。5 × SF Buffer 请勿长时间敞口放置。

ddH ₂ O	to 50μl
5 × SF Buffer (with 10 mM MgSO ₄)	10 μl
25 Mm MgCl ₂ ①	optional
dNTP Mixture (10mM each) ②	1 μl
DMSO ③	optional
5 × PCR Enhancer ④	optional
Template ⑤	optional
Primer 1 (10 μM)	2 μl
Primer 2 (10 μM)	2 μl
ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/μl) ⑥	0.5 μl

①. 对于大多数 PCR 反应, Mg²⁺最佳浓度为 1.5-2 mM。体系中已含有终浓度为 2 mM Mg²⁺, 如有需要, 可用 25 mM MgSO₄, 以 0.2-0.5 mM 为间隔向上摸索 Mg²⁺最佳使用浓度。

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% 时加入终浓度 3% 的 DMSO 有可能会有助于扩增。

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 pg ~ 30 ng
cDNA	1-5 μl (不超过 PCR 反应总体积的 1/10)		



⑥. 推荐的酶的终浓度为 1 U/50 μ l 反应。然而，根据扩增产物的长度和复杂程度不同，可将 ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase 在 0.5 ~ 2 U/50 μ l 反应之间进行优化。但请勿超过 2U/50 μ l，尤其当扩增产子长度大于 5 kb 时。

2. PCR 反应循环的设置

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^①	95°C	30 sec ~ 3 min	1
变性 ^②	95°C	5 ~ 10 sec	} 25 ~ 35 cycles
退火 ^③	45°C ~ 72°C	10 ~ 30 sec	
延伸 ^④	72°C	15 ~ 30 sec/kb	
彻底延伸	72°C	5 ~ 10 min	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 10kb 的扩增产子，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 的扩增产子，变性温度需降低至 92°C，并延长变性时间至 15 sec。

③. ProMan™ 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 \pm 3°C 范围内之间即可。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 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 ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase 酶量，但 50 μ l 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：

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	92°C	2 min	1
变性	92°C	5 ~ 10 sec	} 25 ~ 35 cycles
延伸	68°C	15 ~ 30 sec/kb	
彻底延伸	68°C	5 ~ 10 min	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 \times PCR Enhancer

*推荐反应条件设置：

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性 ^①	98°C	3 min	1
变性 ^②	98°C	10 sec	} 25 ~ 35 cycles
退火 ^③	45°C ~ 72°C	10 ~ 30 sec	
延伸 ^④	72°C	15 ~ 30 sec/kb	
彻底延伸	72°C	5 ~ 10 min	1

5. PCR 反应体系优化方案实例（使用新引物初次扩增目标片段时可参照下述方法优化反应体系）

对于常规 PCR 反应，引物浓度、dNTP 浓度、酶浓度、模板浓度、Mg²⁺ 浓度可不作特别调整，使用前述一般推荐用量即可。当使用新引物初次扩增目标片段时，可使用随酶提供的两种添加剂（DMSO、5 \times PCR Enhancer）对反应体系进行初步优化。多数目标片段通过这一优化即可建立良好的扩增体系。下面以人基因组为模板扩增 6 kb 片段为例（引物退火温度 59.2°C），推荐实验方案为：

组分	20 μ l 反应体系
ddH ₂ O	to 50 μ l
5 \times SF Buffer (with 10 mM MgSO ₄)	4 μ l
dNTP Mixture (10mM each)	0.4 μ l
DMSO	0.6 0 0.6 0 μ l
5 \times PCR Enhancer	0 4 4 0 μ l
Template	100 ng
Primer 1 (10 μ M)	0.8 μ l
Primer 2 (10 μ M)	0.8 μ l
ProMan™ Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/ μ l)	0.4 μ l

引物设计注意事项

1. 引物 3' 端最后一个碱基选择 C 或 G；
2. 引物 3' 端最后 8 个碱基应避免出现连续错配；
3. 引物 3' 端尽量避免出现发夹结构；
4. 引物 Tm 值控制在 55°C-65°C 之间；
5. 引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与引物 Tm 值计算；
6. 引物 GC 含量控制在 40%-60% 之间；
7. 正向引物和反向引物 Tm 值以及 GC 含量尽可能一致。