

## 提高 PCR 的忠实性

### 带有校正功能的酶

包括克隆和效率分析，PCR 产物表达或定点突变在内的 PCR 应用都需要高忠实性的 PCR。Taq DNA 聚合酶被看做是低忠实性的聚合酶，因为其缺少 3'到 5'外切核酸酶（校正）活性。使用带有 3'到 5'外切核酸酶活性的热稳定聚合酶可以提高忠实性。但是这些聚合酶的产量比 Taq DNA 聚合酶低。Platinum Pfx DNA 聚合酶明显比 Taq DNA 聚合酶忠实性高，而且带有 Platinum 产品产量和特异性高的优点。

使用人 thrombospondin 的 1.1kb 片段的探针对基因组 DNA（泳道 1 到 6 分别为 100, 50, 10, 5, 1 和 0ng）扩增 35 个循环。A 组，使用 1 单位 Platinum Pfx Taq DNA 聚合酶，在室温配制反应液。B 组，使用 2.5 单 PfuTurbo™ DNA 聚合酶，在冰上配制反应液。C 组，使用 1 单位 Taq DNA 聚合酶，在冰上配制反应液。

### 酶混合物

将 Taq DNA 聚合酶同带有 3'到 5'外切核酸酶活性第二种聚合酶混合在一起可以获得比单独 Taq DNA 聚合酶高的忠实性，并可以得到高产量及扩增长模板。Gibco BRL 高保真酶混合物，Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 忠实性是单独 Taq DNA 聚合酶的 6 倍，并可以最高扩增到 12kb。

### 其他参数

除了酶，高浓度的 dNTP 或镁离子会降低忠实性。将 dNTP 的浓度从 200μM 降低到 25-50μM 可以增加精确度。如果四种核苷的浓度不同，忠实性会受影响。进行较少的 PCR 循环也会有助于增加忠实性，因为增加循环数目和产物长度就会增加突变可能性。