

Pfu DNA Polymerase

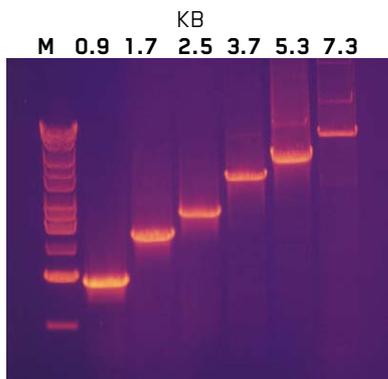
Pfu DNA Polymerase
(*Pyrococcus furiosus*)

Artikel Nr.	Größe
E1114-01	100 Einheiten
E1114-02	500 Einheiten
E1114-03	2500 Einheiten

Definition der Einheit: Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die erforderlich ist, um 10 nmol Deoxyribonukleotide in 30 Minuten bei 74°C in die säureunlösliche Form zu überführen. Die Reaktionsbedingungen für die Bestimmung der Einheiten sind: 50 mM Tris-HCl (pH 9.0 bei 25°C), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 200 µM jeweils von dATP, dCTP, dGTP, dTTP (ein Gemisch aus unmarkiertem und [³H]-markiertem dTTP), 10 µg aktivierte Kalb-Thymus-DNA und 0.1 mg/ml BSA in einem Endvolumen von 50 µl.

Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°C oder bei -70°C



PCR Amplifikation unter Verwendung von EURx Pfu DNA-Polymerase. Spuren M1 und M2: molekulare Größenmarker EURx Perfect™ 1-kb-Leiter und Lambda-DNA / Hind III. Spuren: 0.9 bis 7.3 kb: PCR-Amplifikation mit Pfu Puffer, 0.25 - 0.3 mM dNTPs und 2.5 u EURx Pfu Polymerase in 50 µl Volumen (0.2 ml RK-Gefäße),

Sehr thermostabile DNA-Polymerase mit Korrekturleseaktivität ("proofreading") für die Synthese von DNA bei hohen Temperaturen.

Beschreibung:

- *Pfu DNA-Polymerase* ist ein thermostabiles, aus dem hyperthermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* isoliertes Enzym (1).
- Ultrareines rekombinantes Enzym.
- Das unmodifizierte Enzym repliziert DNA bei 74°C und behält mehr als 95% seiner Aktivität auch nach 1-stündiger Inkubation bei 98°C.
- Das Enzym katalysiert bei Anwesenheit von Magnesium-Ionen die Polymerisation von Nukleotiden zu Duplex-DNA in 5' → 3' Richtung.
- Das Enzym besitzt 3' → 5'' Korrekturleseaktivität ("proofreading") und ermöglicht eine Steigerung der Genauigkeit um den Faktor 10 im Vergleich zu *Taq DNA-Polymerasen* (2).
- *Pfu DNA-Polymerase* wird in PCR-Reaktionen eingesetzt, bei denen hohe Genauigkeit benötigt wird, in PCR von GC-reichen Regionen oder in Bereichen mit problematischen Sekundärstrukturen, Primerextensionen bei erhöhten Temperaturen und zur Erzeugung von Produkten mit stumpfen Enden (blunt ends) zum Einsatz in Ligationsreaktionen.

Lagerungspuffer (Storage Buffer) und Verdünnungspuffer (Dilution Buffer):

50 mM Tris-HCl (pH 8.2 bei 22°C), 0.1 % Tween20, 0.1 % Igepal, 0.1 mM EDTA, 51 mM Dithiothreitol, 50% [v/v] Glycerin und Stabilisatoren.

Der Verdünnungspuffer eignet sich zum Verdünnen der Taq-Stammlösung auf eine gewünschte Konzentration und verhindert ein anschließendes Durchfrieren der verdünnten Lösung bei -20°C.

10 x Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

10 x Pfu Buffer:

Der Puffer enthält 20 mM MgSO₄ und ist für den Gebrauch mit 0.2 - 0.3 mM je dNTP optimiert.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, 3'-Exonuklease-, sowie einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft. Typische Präparationen sind zu mehr als 95 % rein, wie aufgrund von SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese beurteilt werden kann.

Literatur:

1. Lundberg, K., Shoemaker, D., Adams, M., Short, J., Sorge, J. und Mathur E. (1991) *Gene* 108, 1.
2. Cline, J., Braham, J. und Hogrefe, H. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24, 3546.

Pfu DNA Polymerase PCR PROTOKOLL

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
10 x <i>Pfu</i> Buffer (enthält 20 mM MgSO ₄)	5 µl	1x
dNTP Mix (je 5mM)	2.0-3.0 µl	0.2-0.3 mM je dNTP
Vorwärts-Primer	Variabel	0.2-0.5 µM
Reverser Primer	Variabel	0.2-0.5 µM
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	<0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Variabel	-
<i>Pfu</i> DNA Polymerase, 5 U/µl	0.5 µl	2.5 U
Gesamtvolumen	50 µl	-

**Reaktionsbedingungen (PCR-Programm)
für Produkte einer Länge bis 6 kb**

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende Denaturierung	94-95°C	2-5 min	1
Denaturierung	94-95°C	15-60 s	25-35
Annealing	50-68°C	30-60 s	
Extension	72°C	1 min / 1 kb	
Finale Extension	72°C	7 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	1

Hinweise:

- Um lokale Unterschiede in der Salzkonzentration zu vermeiden, sollten alle Bestandteile der PCR-Reaktion vollständig aufgetaut und vor Benutzung gründlich gemischt werden, z.B. durch Vortexen. Das ist besonders wichtig für alle magnesiumhaltigen Lösungen (wie 10x Puffer), da solche Lösungen im gefrorenen Zustand Konzentrationsgradienten bilden.
- Die Reaktionsansätze sollten auf Eis pipettiert werden. Gut mischen.
- Um die Bildung von Primer-Dimeren zu minimieren, wird empfohlen, die PCR Reaktionen in einen PCR-Cycler zu stellen, dessen Block auf die Denaturierungstemperatur (94-95°C) vorgeheizt wurde.
- Pfu* DNA Polymerase sollte die letzte Komponente sein, die zum Reaktionsansatz zugefügt wird. In Abwesenheit von dNTPs kann die Korrekturlese- ("proofreading") Aktivität des Enzyms die Degradation von PCR-Primern verursachen.
- Für *Pfu* DNA Polymerase basierte PCR-Reaktionen beträgt die Standardkonzentration von MgSO₄ 2 mM (wie bei Verwendung des *Pfu* Puffers bereitgestellt). In den meisten Fällen werden mit dieser Konzentration gute Ergebnisse erzielt. Wenn höhere Mg²⁺-Konzentrationen benötigt werden, sollte die beiliegende 25 mM MgSO₄ Stammlösung verwendet werden.
- Die empfohlene dNTP-Endkonzentration für die PCR-Reaktion beträgt 0.2 - 0.3 mM je dNTP (siehe Tabelle "Ansetzen der PCR-Reaktion"), wobei die optimale dNTP Konzentration zwischen verschiedenen Reaktionsansätzen variieren kann. Eine gute Anfangs-Startkonzentration ist 0.2 mM je dNTP. Sollte die finale Ausbeute nicht zufriedenstellend sein, kann schrittweise versucht werden, die dNTP Konzentration bis auf 0.3 mM anzuheben (versuchen Sie 0.2, 0.25, 0.3 mM). Es hat sich gezeigt, dass es in vielen Fällen hilfreich ist, die dNTP-Konzentration bis auf 0.3 mM anzuheben, um bestmögliche Ausbeuten zu erzielen und gleichzeitig die Spezifität und Amplifikationsgenauigkeit der *Pfu* DNA Polymerase zu erhalten.
- Die empfohlene Menge an *Pfu* DNA Polymerase pro Reaktion beträgt 2.5 U je 50 µl PCR-Reaktionsvolumen. Für die meisten Anwendungen ist das Enzym im Überschuss vorhanden und zufriedenstellende Resultate werden erzielt. Eine zu hohe Menge an eingesetztem Enzym kann zu Artefakten, beispielsweise zu verschmierten Banden o.ä. führen.
- Die benötigte Menge an Vorlagen ("Template"-) DNA Molekülen hängt von der Art der zu amplifizierenden DNA-Vorlage ab. Generell wird empfohlen, etwa folgende Mengen einzusetzen: 50-250 ng genomische DNA, 1-50 ng Plasmid- bzw. Phagen-DNA oder 10-100 ng von solchen chromosomalen Genen, die in mehreren Kopien vorliegen.

Hinweise:

- Die Annealing-Temperatur sollte für jedes Primerpaar optimal angepasst werden. Ausgangspunkt sind die Schmelztemperaturen T_m, die auf den Primer-Datenblättern angegeben werden. Die optimale Annealing Temperatur kann ober- oder unterhalb des abgeschätzten T_m liegen. Als Startpunkt für weitere Optimierungen sollte die Annealing-Temperatur zunächst um 5°C unterhalb T_m gewählt werden.
- Die empfohlene Extensionszeit beträgt 1 Minute je 1 kb Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes.