

# Blue *Pfu* DNA Polymerase

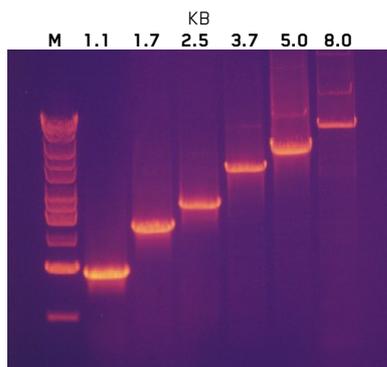
## *Pfu* DNA Polymerase (*Pyrococcus furiosus*)

Artikel Nr.	Größe
E1116-01	100 Einheiten
E1116-02	500 Einheiten
E1116-03	2 500 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 MgCl<sub>2</sub>, 200 µM jeweils von dATP, dCTP, dGTP, dTTP (ein Gemisch aus unmarkiertem und [<sup>3</sup>H]-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 Blue *Pfu* DNA-Polymerase.** Spuren M1 und M2: molekulare Größenmarker EURx Perfect™ 1-kb-Leiter und Lambda-DNA / Hind III. Spuren: 1.1 bis 3.7 kb: PCR-Amplifikation, Puffer B mit 0.1 mM dNTPs und 2.5 u EURx *Pfu* Polymerase in 50 µl Volumen (0.2 ml RK-Gefäße), 1 ng Lambda-DNA als Vorlage, unter den folgenden Bedingungen: 95°C f. 2 Minuten, gefolgt durch 35 Zyklen (95°C f. 20 s, 55°C f. 30 s und 72°C f. 1kb/1min. Spur 5 kb: PCR wie oben mit 0.2 mM dNTPs und 3% DMSO. Spur 8 kb: Puffer C mit 0.35 mM dNTPs, 3% DMSO und 3.1 u EURx *Pfu* Polymerase

**Sehr thermostabile DNA-Polymerase mit Korrekturleseaktivität ("proofreading") für die Synthese von DNA bei hohen Temperaturen. Enthält einen inerten blauen Farbstoff.**

### 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.
- Der zusätzliche blaue Markierungsfarbstoff bringt mehrere Vorteile :
  - + optische Überprüfung, ob Polymerase zur Reaktion hinzugefügt wurde.
  - + optische Kontrolle, ob die Reaktion vollständig durchmischt wurde.
  - + ermöglicht das direkte Beladen des Gels ohne die Notwendigkeit, einen Ladebuffer zuzufügen und erspart so einen Arbeitsschritt für eine Vielzahl von PCR-Reaktionen.
  - + dient als Markerfarbstoff für die Gelelektrophorese.
  - + wirkt sich nicht negativ auf nachfolgende Arbeitsschritte aus wie Ligation, Transformation, automatisierte DNA-Sequenzierung, Restriktionsverdau.
- beseitigt ein Problem, das mit dem von anderen Herstellern häufig verwendeten roten Farbstoff häufig auftritt: Der rote Farbstoff vermindert in der Gelelektrophorese deutlich die Fluoreszenz derjenigen DNA-Banden, welche auf gleicher Höhe mit dem roten Farbstoff migrieren (quenching).

### 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 AmpliBuffer A (Optimierungspuffer ohne MgCl<sub>2</sub>):

500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.1 bei 20°C), 0.1% Triton X-100 und Stabilisatoren. Der Puffer ist für den Gebrauch mit 0.1 - 0.2 mM je dNTP optimiert

#### 10 x AmpliBuffer B (generelle Anwendung, bis zu 6-8 kb):

500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.1 bei 20°C), 0.1% Triton X-100, 15 mM MgCl<sub>2</sub> und Stabilisatoren. Der Puffer ist für den Gebrauch mit 0.1 - 0.2 mM je dNTP optimiert.

#### 10 x AmpliBuffer C (für Produkte größer als 6-8 kb):

60 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 500 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 22°C), 17.5 mM MgCl<sub>2</sub> und Stabilisatoren. Der Puffer ist für den Gebrauch mit 0.35 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.