

## PfuPlus ДНК полимераза

Кат. номер: E0510, E0511

**Назначение:** высокоточный синтез ДНК

**Условия хранения:** -20 °С

**Условия транспортировки:** специальных условий не требуется

### 1. Описание фермента

*PfuPlus* ДНК полимераза представляет собой термостабильный фермент приблизительно 92 kDa, клонированный из *Pyrococcus furiosus*. *PfuPlus* ДНК полимераза осуществляет синтез ДНК в направлении 5'→3' в присутствии ионов магния. Фермент также обладает 3'→5' экзонуклеазной активностью – "проверочная" активность (proofreading). Если полимераза в ходе синтеза ДНК подставляет неправильный нуклеотид, такой нуклеотид быстро удаляется из синтезируемой цепи благодаря "проверочной" активности.

Мы рекомендуем *PfuPlus* ДНК полимеразу для высокоточного синтеза не очень протяженных фрагментов ДНК (до 2 000 пар оснований).

### 2. Постановка ПЦР с использованием *PfuPlus* ДНК полимеразы

При постановке ПЦР с использованием *PfuPlus* ДНК полимеразы очень важно учитывать особенности этого фермента по сравнению с *Taq* ДНК полимеразой. Наличие у *PfuPlus* ДНК полимеразы "проверочной" активности замедляет скорость синтеза и делает фермент более "агрессивным" к находящимся в реакционной смеси праймерам. Исходя из этого при постановке ПЦР с использованием *PfuPlus* ДНК полимеразы нужно всегда следить за выполнением следующих условий:

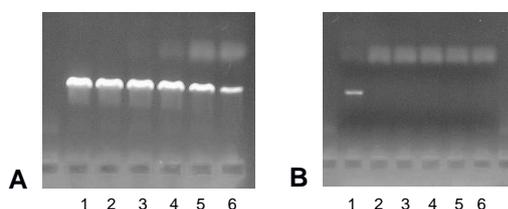
- один из самых существенных моментов – добавление *Pfu* ДНК полимеразы в реакционную смесь. **Фермент нужно добавлять только после добавления в реакционную смесь трифосфатов (dNTPs)**, в противном случае "проверочная" активность фермента приведет к деградации праймеров и значительному увеличению образования неспецифического продукта. Лучше всего готовить смесь на льду и держать ее охлажденной до самого момента постановки в амплификатор.
- мы рекомендуем использовать 1.5 – 2.5 ед. фермента в реакцию. Добавление большего количества приводит к повышению вероятности деградации праймеров за счет 3'→5' экзонуклеазной активности.
- желательно использовать праймеры с более богатым GC составом.

### 3. Чувствительность ПЦР с использованием *PfuPlus* ДНК полимеразы

Как уже говорилось выше, наличие у *PfuPlus* ДНК полимеразы "проверочной" 3'→5' экзонуклеазной активности замедляет скорость синтеза. Это сказывается на конечном выходе продукта.

#### Разница выхода конечного продукта в зависимости от количества добавленной матрицы

ДНК матрица:	бактериальная ДНК <i>Mycoplasma hominis</i>
Размер генома <i>M. hominis</i> :	0.68x10 <sup>6</sup> пар оснований
Объем смеси:	25 мкл
Размер фрагмента:	334 пар нуклеотидов
Количество циклов:	40



нанесение по дорожкам:

1 – 1 нг, 2 – 100 пг, 3 – 10 пг, 4 – 1 пг, 5 – 100 фг, 6 – 10 фг

A : ColoredTaq полимераза, 1.25 ед. в смеси

B : PfuPlus полимераза, 2.5 ед. в смеси

#### 4. Выводы и рекомендации

##### Плюсы

*PfuPlus* ДНК полимеразы позволяет получать копии с минимальным количеством ошибок.

##### Минусы

1. низкая скорость работы *PfuPlus* ДНК полимеразы и, как следствие, см. п. 2
2. требуется больше матрицы

Мы рекомендуем для работы с *PfuPlus* ДНК полимеразой брать количество ДНК, рассчитанное в соответствии с приводимой ниже таблицей.

##### Рекомендуемое количество матрицы, добавляемой в ПЦР с использованием *PfuPlus* полимеразы

Число копий	Бактериальный геном	Эукариотический геном
1	$4 \times 10^{-15}$ г (4 fg)	$6 \times 10^{-12}$ г (6 pg)
10	$4 \times 10^{-14}$ г (40 fg)	$6 \times 10^{-11}$ г (60 pg)
100 ( $10^2$ )	$4 \times 10^{-13}$ г (400 fg)	$6 \times 10^{-10}$ г (600 pg)
1'000 ( $10^3$ )	$4 \times 10^{-12}$ г (4 pg)	<b><math>6 \times 10^{-9}</math> г (6 ng)</b>
10'000 ( $10^4$ )	$4 \times 10^{-11}$ г (40 pg)	<b><math>6 \times 10^{-8}</math> г (60 ng)</b>
100'000 ( $10^5$ )	<b><math>4 \times 10^{-10}</math> г (400 pg)</b>	$6 \times 10^{-7}$ г (600 ng)
1'000'000 ( $10^6$ )	<b><math>4 \times 10^{-9}</math> г (4 ng)</b>	$6 \times 10^{-6}$ г (6 µg)
10'000'000 ( $10^7$ )	$4 \times 10^{-8}$ г (40 ng)	$6 \times 10^{-5}$ г (60 µg)

Размер бактериального генома:  $0.5-5 \times 10^6$  пар оснований

Размер человеческого генома:  $3 \times 10^9$  пар оснований

Зеленым цветом отмечены те количества, которые мы рекомендуем добавлять в реакционную смесь для успешного проведения ПЦР.

#### 5. Контактные данные

телефон: +7 495 737 4224

эл. почта: [info@sileks.com](mailto:info@sileks.com)