

Pfu Polimeraza DNA

Polimeraza *Pfu* jest termostabilną polimerazą DNA pochodzącą ze szczepu *Pyrococcus furiosus*. Enzym o masie 92kDa prowadzi reakcję syntezy DNA w kierunku 5'→3' w obecności jonów Mg^{2+} . Enzym posiada również aktywność 3'→5' egzonukleazową, tzw. „aktywność kontrolną” (proofreading). Aktywność proofreading powoduje usunięcie nieprawidłowo wprowadzonego nukleotydu z nowo syntetyzowanej nici DNA.

Nie zalecamy użycia *Pfu* Polimerazy DNA do syntezy fragmentów powyżej 2 kbp !

Prowadzenie reakcji PCR z zastosowaniem *Pfu* Polimerazy DNA

Przygotowując reakcję syntezy DNA w oparciu o *Pfu* Polimerazę DNA należy bardzo dokładnie obliczyć ilość enzymu, którą zamierzamy użyć w reakcji. Obecność „aktywności kontrolnej” zwalnia prędkość syntezy i może spowodować degradację starterów w środowisku reakcji.

Należy również zwrócić uwagę na kolejność dodawania poszczególnych składników reakcji. Jednym z najistotniejszych momentów reakcji jest dodanie samego enzymu. Polimerazę należy dodać do mieszaniny reakcyjnej wyłącznie po dodaniu trifosforanów nukleotydów (dNTPs), w przeciwnym przypadku aktywność *proofreading* prowadzi do degradacji starterów i do utworzenia się większej ilości niespecyficznych produktów. Przygotowanie reakcji powinno mieć miejsce w niższej temp niż temperatura pokojowa, najlepiej w lodzie.

Zalecenia:

- Stosowanie nie więcej niż 1,5-2,5 U polimerazy *Pfu* na reakcję. Zwiększenie ilości polimerazy może spowodować szybszą degradację starterów.
- Zastosowanie starterów z większą ilością nukleotydów G i C.
- Zalecana temperatura denaturacji 92°C
- Czas elongacji, w zależności od długości produktu, powinien być 2-5× dłuższy niż w przypadku *Taq* Polimerazy DNA.
- Preferowane stężenie jonów Mg^{2+} dla *Pfu* Polimerazy DNA wynosi 2-4 mM.

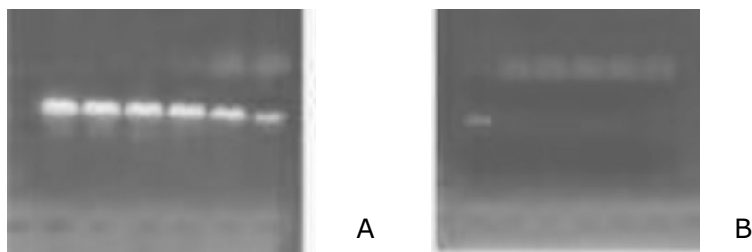
Czułość *Pfu* Polimerazy DNA w reakcjach syntezy DNA.

Obecność aktywności egzonukleazy 3'→5' powoduje zwolnienie prędkości syntezy DNA, czego efektem może być zmniejszenie końcowej wydajności reakcji.

Różnica końcowej ilości produktu w zależności od ilości matrycy użytej do reakcji syntezy DNA.

Matryca: DNA bakteryjny *Mycoplasma hominis*
Rozmiar genomu : 0.68×10⁶ pz
Objętość reakcji : 25µl
Długość produkty PCR: 334 pz
Ilość cykli: 40

Pfu Polimeraza DNA



Ilość DNA naniesiona na poszczególne ścieżki:

1 - 1 ng, 2 - 100 pg, 3 - 10 pg, 4 - 1 pg, 5 - 100 fg, 6- 10 fg

A - *Taq* Polimeraza, 1.25 U

B - *Pfu* Polimeraza, 2.5 U

Zalety i wady stosowania *Pfu* Polimerazy DNA w syntezie DNA:

Największą zaletą *Pfu* Polimerazy DNA jest minimalną ilością wprowadzonych błędów.

Pozwala to na bardzo dokładną syntezę DNA. Wadą jest relatywnie niewielka prędkość syntezy DNA.

Podczas przygotowywania reakcji z *Pfu* Polimerazą zalecamy stosowanie następujące ilości matrycy:

Zalecana ilość matrycy w reakcjach z zastosowaniem *Pfu* Polimerazy DNA

Liczba kopii	Bakteryjny DNA (genomowy)	Eukariotyczny DNA (genomowy)
1	4×10^{-15} g (4 fg)	6×10^{-12} g (6 pg)
10	4×10^{-14} g (40 fg)	6×10^{-11} g (60 pg)
100 (10^2)	4×10^{-13} g (400 fg)	6×10^{-10} g (600 pg)
1 000 (10^3)	4×10^{-12} g (4 pg)	6×10^{-9} g (6 ng)
10 000 (10^4)	4×10^{-11} g (40 pg)	6×10^{-8} g (60 ng)
100 000 (10^5)	4×10^{-10} g (400 pg)	6×10^{-7} g (600 ng)
1 000 000 (10^6)	4×10^{-9} g (4 ng)	6×10^{-6} g (6 ug)
10 000 000 (10^7)	4×10^{-8} g (40 ng)	6×10^{-5} g (60 ug)

Na czerwono zaznaczyliśmy ilość matrycy zalecaną w reakcjach syntezy DNA.

Rozmiar genomu bakteryjnego - $0.5-5 \times 10^6$ pz

Rozmiar genomu człowieka - 3×10^9 pz