

## Datenblatt

### Pfu-DNA-Polymerase 100 U

Kat.-Nr. CH1056,0100: 100 U in 20 µL  
Kat.-Nr. CH1056,0500: 500 U in 100 µL  
(Nur für Forschung und In-vitro-Anwendungen)

Chargen-Nr.: MED0910-1-2  
Mindestens haltbar bis: 10/2013  
Aussehen: klare Flüssigkeit  
Farbe: transparent  
Lieferumfang (farbige Deckelcodierung):

		100 U	500 U
blau	Pfu-DNA-Polymerase (5 U/µL)	20 µL	100 µL
rot	Reaktionspuffer I (10x)	1000 µL	1000 µL
gelb	Reaktionspuffer C (10x)	1000 µL	1000 µL
farblos	MgSO <sub>4</sub> -Lösung (100 mM)	1000 µL	1000 µL
schwarz	Verdünnungspuffer	1000 µL	1000 µL

**Konzentration:** 5 Units/µl

**Beschreibung:** Thermostabile Polymerase von ca. 92 kDa, ursprünglich isoliert aus dem hyperthermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*. Das Enzym repliziert DNA bei einem Optimum von 75 °C, indem es die Polymerisation von Nukleotiden zu Duplex-DNA in 5' → 3'-Richtung in Anwesenheit von Mg (bevorzugt MgSO<sub>4</sub>) katalysiert. Anders als Taq-DNA-Polymerase verfügt Pfu-DNA-Polymerase zudem über eine 3' → 5' Exonuklease-Aktivität, die sog. „Proofreading-Aktivität“, welche die Korrektur falsch eingebauter Nukleotide und somit die Herstellung von nahezu fehlerfreien PCR-Produkten ermöglicht. Die Genauigkeit der DNA-Synthese ist gegenüber der Taq-DNA-Polymerase um das Zwölffache erhöht; die Fehlerrate liegt bei  $0,2 \times 10^{-5}$ . Die mit Pfu-DNA-Polymerase erzeugten PCR-Produkte haben glatte Enden („blunt ends“) und können direkt in Ligationsreaktionen eingesetzt werden. Die Extensionsrate von Pfu-DNA-Polymerase liegt bei 0,5 kb/min, deshalb werden 1 – 2 min Extensionszeit/kb Fragment empfohlen.

**Anwendungsgebiete:** PCR- und Primer-Extensions-Reaktionen, die eine sehr hohe Genauigkeit erfordern.

**Qualitätskontrolle:** Einsatz in Test-PCRs; Überprüfung auf DNA-Hintergrund

**Lagerungspuffer:** 50 mM Tris-HCl (pH 8,2), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 % Nonidet P40, 0,1 % Tween 20 und 50 % Glycerol

**Reaktionspuffer:**

- 10x Reaktionspuffer I (frei von Mg<sup>2+</sup>): 200 mM Tris•HCl (pH 8,8), 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 % Triton X-100, 1 mg/mL BSA (nukleasefrei)
- 10x Reaktionspuffer C (mit Mg<sup>2+</sup>): 200 mM Tris•HCl (pH 8,8), 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 % Triton X-100, 1 mg/mL BSA (nukleasefrei)

**Protokoll:** Die Pfu-DNA-Polymerase ist frei von bakterieller DNA und damit besonders geeignet für sensitive Amplifizierungen. Das optimale Volumen an Pfu-DNA-Polymerase bei der Amplifizierung genomischer DNA beträgt 0,016 – 0,062 µL in einem 25-µL-Reaktionsansatz. Dies entspricht 0,08 – 0,3 U Enzym/Reaktion. Eine zu große Menge an Enzym führt zunächst zu unspezifischen Produkten (0,625 – 1,3 U), später zu einem völligen Fehlen von DNA-Fragmenten (2,5 U). Die optimale Menge an Pfu-DNA-Polymerase bei der Amplifizierung von Plasmid-DNA beträgt 0,625 – 1,25 U/25 µL Reaktionsansatz.

Die einzelnen Komponenten sollten in folgender Reihenfolge pipettiert werden:

- Reaktionspuffer I oder C (Endkonzentration 1x)
- H<sub>2</sub>O
- Optional: MgSO<sub>4</sub> (empfohlene Endkonzentration 2,0 mM) (nur bei Verwendung von Reaktionspuffer I erforderlich)
- dNTPs (0,1 – 0,3 mM)
- DNA-Template (1 - 25 ng/25 µl Reaktionsvolumen)
- Primer (10 – 50 pmol/25 µl Reaktionsvolumen)
- Polymerase (0,08 – 0,3 U/25 µl Reaktionsvolumen).

**Versand:** bei Umgebungstemperatur

**Lagerung:** bei - 20 °C

Sicherheitshinweis: Dieses Produkt sollte nur von Personen verwendet werden, die Routine in Laboranwendungen haben. Es sollte laborübliche Schutzkleidung wie Kittel, Handschuhe und Schutzbrillen getragen werden. Bei Kontakt mit Haut und Augen sollten die betroffenen Stellen umgehend mit Wasser gewaschen bzw. ausgespült werden.  
Anwendungshinweis: In bestimmten Ländern sind einige Anwendungen, für die dieses Produkt eingesetzt werden kann, patentrechtlich geschützt. Da durch den Kauf keine Lizenzen erworben werden, kann abhängig vom Anwendungsland und der Anwendung der Erwerb entsprechender Lizenzrechte erforderlich sein.