

## *Pfu*-полимераза (рекомбинантная)

### Описание фермента

*Pfu* ДНК полимераза представляет собой термостабильный фермент приблизительно 92 kDa, клонированный из *Pyrococcus furiosus*. *Pfu* ДНК полимераза осуществляет синтез ДНК в направлении 5'→3' в присутствии ионов магния. Фермент также обладает 3'→5' экзонуклеазной активностью – "проверочная" активность (proofreading).

Мы рекомендуем *Pfu* ДНК полимеразу для высокоточного синтеза не очень протяженных фрагментов ДНК (до 2'000 пар оснований). Тем не менее *Pfu* ДНК полимераза успешно применялась нами для синтеза фрагментов длиной до 8 000 п.о.

*Pfu* ДНК полимераза является гипертермостабильным ферментом. Время полуинактивации при 95С превышает 5 часов. Таким образом, при использовании данного фермента можно увеличивать температуру денатурации до 98С (при амплификации GC-богатых последовательностей). Однако при повышенной температуре возрастает дезаминирование dCTP с образованием dUTP, который является сильным ингибитором полимеразной активности данного фермента. По этой же причине dTTP в реакции с *Pfu*-полимеразой не может быть заменен на dUTP.

### Постановка ПЦР с использованием *Pfu* ДНК полимеразы

При постановке ПЦР с использованием *Pfu* ДНК полимеразы очень важно учитывать особенности этого фермента по сравнению с *Taq* ДНК полимеразой. Наличие у *Pfu* 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 *Pfu* ДНК полимеразы нужно всегда следить за выполнением следующих условий:

**1. Фермент нужно добавлять только после добавления в реакционную смесь нуклеотидтрифосфатов (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 ("холодный старт").

**2.** мы рекомендуем использовать 1,0 – 1,5 ед. фермента на реакцию. Добавление большего количества приводит к повышению вероятности деградации праймеров за счет 3'→5' экзонуклеазной активности.

**3.** Рекомендуемое время элонгации составляет 1-2 минуты на 1 000 п. н. ампликона.

Пример ПЦР-реакции с использованием *Pfu* ДНК-полимеразы (из расчета на 50 мкл)

	Объем, мкл	Конечная концентрация
10X <i>Pfu</i> Buffer	5 мкл	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 мМ)	2 мкл	2 мМ
dNTP mix (2 мМ)	5 мкл	0.2 мМ
Прямой праймер	5-50 пмоль	0,1-1 мкМ
Обратный праймер	5-50 пмоль	0,1-1 мкМ
Матричная ДНК	Различный объем	≤ 0,5 мкг/50 мкл
<i>Pfu</i> ДНК полимераза	0,5-0.75 мкл	1-1,5 U/50 мкл
H <sub>2</sub> O	До 50 мкл	



### Пример условий амплификации с использованием *Pfu* ДНК-полимеразы

Шаг	Температура	Время	Количество циклов
Начальная денатурация	95°C	1-2 мин	1
Денатурация	95°C	0,5-1 мин	20-35
Отжиг	42-65°C	30 сек	
Элонгация	72-74 °C	2 мин/ 1000 пар	
Финальная элонгация	72-74 °C	5 мин	1
Хранение	4°C	-	1

### Чувствительность ПЦР с использованием *Pfu* ДНК полимеразы

Как уже говорилось выше, наличие у *Pfu* ДНК полимеразы "проверочной" 3'→5' экзонуклеазной активности замедляет скорость синтеза. Это сказывается на конечном выходе продукта. В общем случае, необходимо использовать более высокие концентрации матрицы для амплификации с помощью *Pfu* полимеразы (желательно в диапазоне 1-100 нг, но не превышая 0,5 мкг на 50 мкл реакционной смеси).

По вопросам связанным с использованием *Pfu* полимеразы обращаться:  
Квач Сергей  
(MTS). +375-29-753-15-85