

Enzima: Polμ-H6 (DNA polimerasa mu humana con tag de 6 histidinas)**Cantidad: 50 unidades / 11.25 μg (50 μl) No. Catálogo: XP1003401**

Concentración: 1 U/μl (225 ng/μl)

Peso Molecular: 55 kDa

Origen: células de *E. coli* portadoras de la secuencia nucleotídica de Pol mu humana con un tag que incluye 6 histidinas en el extremo amino terminal

Condiciones de almacenamiento: -20°C

♦ *Sólo para uso en investigación*

MATERIALES	CANTIDAD
Polμ-H6 (1 U/μl)	50 unidades
Reaction Buffer 10X	1 ml
MnCl ₂ 10X (10 mM)	1 ml
Dilution Buffer 1X	500 μl

Características

- Capacidad de polimerización independiente de molde (actividad transferasa terminal) sobre sustratos de DNA de cadena sencilla y doble (1, 6, 7)
- Capacidad de polimerización distributiva, dependiente de molde, sobre sustratos de DNA de tipo "template primer" y "gap". La presencia de un grupo 5'P en el gap estimula la actividad del enzima (1, 2)
- Muy versátil en el uso de nucleótidos de distinto tipo: deoxinucleótidos, ribonucleótidos, dideoxinucleótidos y nucleótidos modificados (4, 5)
- Alta capacidad mutadora (debido a su alta tasa de inserción de errores (10⁻¹) unido a la ausencia de actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores (1-3)

Aplicaciones

- Marcaje 3' terminal de extremos de DNA de cadena sencilla y doble utilizando cualquier tipo de nucleótido, incluso ribonucleótidos.
- Procedimientos de mutagénesis *in vitro*.
- Generación de extremos 3' protuberantes gracias a la actividad transferasa terminal.

Definición de Unidad de Actividad

La DNA polimerasa mu humana es capaz de catalizar la incorporación de nucleótidos (dNTPs, rNTPs y ddNTPs) tanto en reacciones dependientes como independientes de molde (transferasa terminal), así como puede ser activada por diferentes cationes divalentes (MnCl₂, MgCl₂ y CoCl₂). A continuación se definen condiciones experimentales estándar (definición de unidad) para estos dos tipos principales de polimerización.

DNA polimerasa (actividad dependiente de molde):

- Una unidad de enzima (225 ng) cataliza la incorporación de 0.4 pmol de dAMP en un PolidA (50 nt) hibridado a un PolidT (21 nt) en 10 min a 30°C en un volumen de reacción de 20 μl en presencia de 1 mM MnCl₂.

Condiciones de ensayo: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 1% glicerol, 0.1 mM BSA, 1 mM MnCl₂, 0.5 μM PolidA/PolidT, 1 μM dATP (incluirl 5 μCi [α-³²P] dATP).

*La reacción es posible también en presencia de MgCl₂ y CoCl₂, con una eficiencia en ambos casos 100 veces menor que en el caso del MnCl₂.

Transferasa terminal (actividad independiente de molde):

- Una unidad de enzima (225 ng) cataliza la incorporación de 0.13 pmol de dAMP en un PolidA (50 nt) en 30 min a 30°C en un volumen de reacción de 20 μl en presencia de 1 mM MnCl₂.

Condiciones de ensayo: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 1% glicerol, 0.1 mM BSA, 1 mM MnCl₂, 0.5 μM PolidA (50 nt), 1 μM dATP (incluirl 5 μCi [α-³²P] dATP).

*La reacción es posible también en presencia de MgCl₂ y CoCl₂, con una eficiencia respectivamente de 140 y 70 veces menor que en el caso del MnCl₂.

Mezcla de almacenamiento/ Dilution Buffer

- El enzima se suministra en: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT y 50% (v/v) glicerol. Se suministra este mismo buffer con objeto de realizar diluciones del enzima.

Reaction Buffer 10X

- 500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM DTT, 40% glicerol, 1 mg/ml BSA.

Control de calidad

- La DNA polimerasa mu humana con tag de 6 histidinas (Polμ-H6) carece de actividad endonucleasa tanto sobre DNA de cadena sencilla (oligonucleótidos de distinta longitud) como sobre DNA de cadena doble (oligonucleótidos complementarios de distinta longitud hibridados entre sí) tras una incubación de 1 h a 30°C.

Control de actividad

- Relleno de gaps en DNA activado de tino de ternera :
Condiciones de ensayo: en un volumen de 25 μl, cada reacción contiene 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 0.01 U de DNA activado de tino de ternera (27-4563-01, GE Healthcare), 1 U (225ng) de Polμ, 1 μCi [α-³²P] dATP. Tras una incubación de 15 min a 30°C, la incorporación total de nucleótido puede ser cuantificada a partir de la radiación Cerenkov tras filtración en columnas de Sephadex G-50 (1)

Referencias

- Domínguez et al. (2000). DNA polymerase mu (Pol μ), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *EMBO J.*, **19**, 1731–1742.
- Ruiz et al. (2004). Overexpression of human DNA polymerase mu (Pol mu) in a Burkitt's lymphoma cell line affects the somatic hypermutation rate. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5861-73
- Zhang et al. (2001). Highly Frequent Frameshift DNA Synthesis by Human DNA Polymerase μ. *Mol Cell Biol.*, **21**, 7995–8006.
- Nick McElhinny et al. (2003). Polymerase Mu Is a DNA-Directed DNA/RNA Polymerase. *Mol Cell Biol.*, **23**, 2309–2315.
- Ruiz et al. (2003). Lack of sugar discrimination by human Pol μ requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4441–4449.
- Juárez et al.(2006). A specific loop in human DNA polymerase mu allows switching between creative and DNA-instructed síntesis. *Nucleic Acids Res.* **34**, 4572–4582.
- Andrade et al. (2009). Limited terminal transferase in human DNA polymerase μ defines the required balance between accuracy and efficiency in NHEJ. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106**, 16203–16208.