

# Perpetual Taq DNA Polymerase

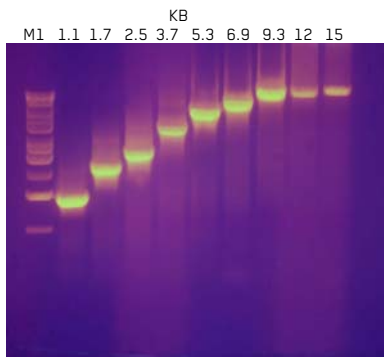
PCR System mit monoklonalem Antikörper für automatisierten "Hot Start"

## Taq DNA Polymerase (*Thermus aquaticus*)

| Artikel Nr. | Größe          |
|-------------|----------------|
| E2700-01    | 200 Einheiten  |
| E2700-04    | 500 Einheiten  |
| E2700-02    | 1000 Einheiten |
| E2700-03    | 5000 Einheiten |

Definition der Einheit: Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die erforderlich ist, um 10 nmol Deoxyribonukleotide in 30 Minuten bei 74°C in die säureunlösliche Form zu überführen. Die Reaktionsbedingungen für die Bestimmung der Einheiten sind: 50 mM Tris-HCl (pH 9.0 bei 25°C), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM jeweils von dATP, dCTP, dGTP, dTTP (ein Gemisch aus unmarkiertem und [<sup>3</sup>H]-markiertem dTTP), 10 µg aktivierte Kalb-Thymus-DNA und 0.1 mg/ml BSA in einem Endvolumen von 50 µl.

**Lagerbedingungen:**  
Lagerung bei -20°C



PCR Amplifikation unter Verwendung von EURx Perpetual Taq DNA-Polymerase. Spur M: Molekularer Größenmarker EURx Perfect™ 1-kb-Leiter (E3130-02). Spuren: 0.9 bis 9.3 kb: PCR-Amplifikation unter Verwendung von Puffer B mit 0.2 mM dNTPs und 1,25 U EURx Perpetual Taq DNA Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

Um eine vollständige Denaturierung des Antikörpers nach Durchlaufen der ersten Temperaturrampe zu gewährleisten, wird empfohlen, zu Beginn der PCR-Reaktion einen initialen Denaturierungsschritt für 3-5 Minuten bei 95°C einzufügen.

**Thermostabile Taq DNA-Polymerase, vorkomplexiert mit einem spezifischen monoklonalen anti-Taq Antikörper für automatische "hot start" PCR. Das "hot start" PCR System besitzt im Vergleich zu unmodifizierter Taq DNA Polymerase eine stark erhöhte Amplifikationsspezifität, Sensitivität und Ausbeute.**

### Beschreibung:

- Die ultrareine, rekombinante Taq DNA-Polymerase ist reversibel mit einem monoklonalen anti-Taq Antikörper komplexiert, der die Replikationsaktivität des Enzyms bei moderaten Temperaturen blockiert.
- Der sorgfältig ausgewählte anti-Taq Antikörper hat eine hohe thermische Stabilität. Er schützt vor unspezifischer Primerextension während der ersten PCR-Zyklen, insbesondere bei der ersten Temperaturrampe von Raumtemperatur auf 70°C.
- Die zunächst durch den monoklonalen Antikörper blockierte DNA Polymerase-Aktivität wird während des einleitenden Denaturierungsschrittes wieder hergestellt. Hierzu muss der Reaktionsmix für zwei Minuten auf 94-95°C erhitzt werden.
- Die Notwendigkeit zum Öffnen von Reaktionsgefäßen nach erfolgter erster Denaturierung bei 95°C zum nachträglichen Zufügen von Taq DNA-Polymerase entfällt. Hierdurch sinkt das Risiko von Kreuzkontaminationen und unterstützt somit eine sichere Laborpraxis.
- Die Bildung von Komplexen zwischen der Taq DNA-Polymerase und einem anti-Taq Antikörper blockiert die Restaktivität der Polymerase bei Raumtemperatur und ermöglicht das bequeme Zusammenpipettieren von PCR - Reaktionen bei Raumtemperatur.
- Die hohe Stabilität der Komplexe führt zu einer enormen Zunahme im Hinblick auf PCR-Spezifität Ausbeute und Empfindlichkeit im Vergleich mit herkömmlichen PCR-Reaktionen.
- Die automatische "Hot Start" PCR ist eine schnelle, günstige und reproduzierbare Methode und vereinfacht den Ansatz einer hohen Zahl von PCR Reaktionen.
- Sowohl die erhöhte Spezifität als auch die Reduktion an fehlerhaftem Priming (mispriming) verbessern die Qualität der Multiplex-PCR.
- Katalysiert die Polymerisation von Nukleotiden zu Duplex-DNA in 5'→3' Richtung bei Anwesenheit von Magnesiumionen.
- Besitzt 5'→3' Exonuklease-Tätigkeit.
- Besitzt keine 3'→5' Exonuklease Aktivität.
- Fügt ein überhängendes A am 3'-Ende an (betrifft etwa 5% der Amplikons).
- Perpetual Taq DNA-Polymerase wird zum Einsatz in PCR- und Primer-Extensionsreaktionen (primer extension) bei hohen Reaktionstemperaturen empfohlen. Mit diesem Enzym können DNA-Produkte einer Länge bis zu 10 kb erhalten werden.

### Lagerungspuffer (Storage Buffer) und Verdünnungspuffer (Dilution Buffer):

20 mM Tris-HCl (pH 8.0 bei 22°C), 100 mM KCl, 0.5 % Tween20, 0.5 % Igepal CA-630, 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 50% (v/v) Glycerin.

### 10 x Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

#### 10 x Pol Buffer A (Optimierungspuffer ohne MgCl<sub>2</sub>):

Dieser Puffer enthält kein MgCl<sub>2</sub> und erlaubt die Optimierung der MgCl<sub>2</sub> - Konzentration.

#### 10 x Pol Buffer B (generelle Anwendung, bis zu 10 kb):

Der Puffer enthält 15 mM MgCl<sub>2</sub> und ist für den Gebrauch mit 0.1 - 0.2 mM je dNTP optimiert.

#### 10 x Pol Buffer C (violett gefärbt):

Dieser Puffer entspricht in der Zusammensetzung dem Puffer B, er ist aber zusätzlich mit zwei Farbstoffen und einer Gel-Schwerelösung angereichert. Mit diesem Puffer können Aliquots der PCR-Reaktion direkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen werden, ohne Zugabe eines separaten Gel-Ladepuffers.

### Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, 3'-Exonuklease-, sowie einzel- und doppelsträngige DNase-Aktivitäten geprüft. Typische Präparationen sind zu mehr als 95 % rein, wie aufgrund von SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese beurteilt werden kann.

### Literatur:

1. Chien, A., Edgar, D.B. und Trela, J.M. (1976) J. Bacteriol. 127, 1550.
2. Kaledin, A.S., Sliusarenko, A.G. und Gorodetskii, S.I. (1980) Biokhimiya 45, 644.

# Perpetual *Taq* DNA Polymerase „HOT START“ PCR PROTOKOLL

## Ansetzen der PCR Reaktion:

| Komponente  | Volumen je Reaktion  | Endkonzentration          |
|---|--|---------------------------|
| 10 x Pol Buffer A oder<br>10 x Pol Buffer B oder<br>10 x Pol Buffer C | 5 µl   | 1x                        |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>   | 2 - 10 µl bei<br>Verwendung von 10 x<br>Pol Buffer A oder<br>0 - 7 µl bei<br>Verwendung von 10x<br>Pol Buffer B oder C | 1 - 5mM<br><br>1.5 - 5 mM |
| dNTP Mix (je 5mM)   | 2 µl   | 0.2 mM je dNTP            |
| Vorwärts-Primer   | Variabel   | 0.1-0.5 µM                |
| Reverser Primer   | Variabel   | 0.1-0.5 µM                |
| Perpetual <i>Taq</i> DNA<br>Polymerase, 2.5U/µl                       | 0.5µl  | 1.25 U                    |
| Vorlagen- ("Template")<br>DNA   | Variabel   | <0.5 µg/50 µl             |
| Steriles, doppelt<br>destilliertes Wasser                             | Variabel   | -                         |
| Gesamtvolumen   | 50 µl  | -                         |

## Reaktionsbedingungen (PCR-Programm):

| Schritt                      | Temperatur | Zeit       | Anzahl der<br>Zyklen |
|------------------------------|------------|------------|----------------------|
| Einleitende<br>Denaturierung | 94-95°C    | 2-5 min    | 1                    |
| Denaturierung                | 94-95°C    | 15-60 s    | 25-35                |
| Annealing                    | 50-68°C    | 30-60 s    |                      |
| Extension                    | 72°C       | 1 min/1 kb |                      |
| Finale Extension             | 72°C       | 7 min      | 1                    |
| Kühlschritt                  | 4°C        | Unbegrenzt | 1                    |

## Hinweise:

- Um lokale Unterschiede in der Salzkonzentration zu vermeiden, sollten alle Bestandteile der PCR Reaktion vollständig aufgetaut und vor Benutzung gründlich gemischt werden, z.B. durch Vortexen. Das ist besonders wichtig für alle magnesiumhaltigen Lösungen (wie 10x facher Puffer), da solche Lösungen im gefrorenen Zustand Konzentrationsgradienten bilden.
- Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der *Taq* DNA Polymerase zunächst durch den monoklonalen Antikörper reversibel inhibiert wird. Gut mischen.
- Ein Vorheizen des Thermocycler-Blocks auf 94-95°C vor Hineinstellen der PCR-Reaktionsansätze ist - im Unterschied zu Nicht-"HotStart" DNA Polymerasen - nicht notwendig.
- Bei Verwendung einer dNTP Konzentration von 0.2 mM je dNTP beträgt die Standard-Endkonzentration von MgCl<sub>2</sub> in PCR Reaktionen 1.5 mM (wie in Pol Puffer B bereitgestellt). In den meisten PCR Reaktionen werden mit dieser Konzentration zufriedenstellende Resultate erzielt. In einigen Fällen ist es jedoch notwendig, die optimale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration experimentell zu bestimmen. Für diesen Zweck ist Puffer A vorgesehen.
- Bei Verwendung des gefärbten 10 x Pol Puffers C können Aliquots der PCR Reaktion direkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen werden. Die Zugabe eines separaten Gel-Ladepuffers ist nicht notwendig. Der Puffer enthält bereits eine Gel-Schwerelösung sowie zwei Farbstoffe, die im Verlaufe der Elektrophorese voneinander getrennt werden. In einem 1% [v/v] Agarose-Gel bewegt sich der rote Farbstoff etwa in Höhe eines 600 bp Fragmentes, während der gelbe Farbstoff schneller als 20 bp migriert. Die Farbstoffe beeinträchtigen die meisten nachfolgenden, enzymatisch katalysierten Reaktionen nicht. Trotzdem wird es empfohlen, PCR-Produkte vor der weiteren Verwendung aufzureinigen.
- Die empfohlene Menge an Perpetual *Taq* DNA Polymerase pro Reaktion beträgt 1.25 U je 50 µl PCR-Reaktionsvolumen. Für die meisten Anwendungen ist das Enzym im Überschuss vorhanden und zufriedenstellende Resultate werden erzielt. Eine zu hohe Menge an eingesetztem Enzym kann zu Artefakten, beispielsweise zu verschmierten Banden führen.
- Die optimale Menge an Vorlagen ("Template"-) DNA Molekülen beträgt etwa 10<sup>4</sup> Kopien der Zielsequenz. Ausgehend von etwa dieser Menge wird ein PCR Signal in 25 bis 35 Zyklen erhalten. Zur besseren Orientierung: 1 µg von 1 kb ds DNA entspricht 9.1 x 10<sup>11</sup> Molekülen, 1 µg von *E. coli* genomischer DNA entspricht 2 x 10<sup>9</sup> Molekülen, 1 µg von menschlicher genomischer DNA entspricht 3 x 10<sup>5</sup> Molekülen.

## Hinweise:

- Eine einleitende Denaturierung von 2 min Dauer ist zwingend notwendig, um den Antikörper zu denaturieren und die Aktivität der DNA Polymerase wieder herzustellen.
- Die Annealing-Temperatur sollte für jedes Primerpaar optimal angepasst werden. Ausgangspunkt sind die Schmelztemperaturen T<sub>m</sub>, die auf den Primer-Datenblättern angegeben werden. Die optimale Annealing Temperatur kann ober- oder unterhalb des abgeschätzten T<sub>m</sub> liegen. Als Startpunkt für weitere Optimierungen sollte die Annealing-Temperatur zunächst um 5°C unterhalb T<sub>m</sub> gewählt werden.
- Wenn lange PCR-Produkte (über 5 kb Länge) amplifiziert werden sollen, dann soll:
  - eine einleitende Denaturierung für 2 min bei 94°C durchgeführt werden.
  - je Zyklus sollte die Denaturierung 15-20 s bei 94°C betragen
  - eine Elongationstemperatur von 68°C anstelle von 72°C gewählt werden. Diese Elongationstemperatur wird auch für die Amplifikation extrem AT-reicher (also GC-ärmer) Sequenzabschnitte empfohlen, beispielsweise für einige Bereiche des *Arabidopsis*-Genoms.