

Color Perpetual OptiTaq DNA Polymerase

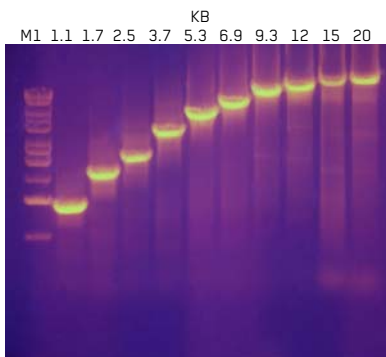
PCR System mit monoklonalem Antikörper für automatisierten "Hot Start"

Taq DNA Polymerase
(*Thermus aquaticus*)
Pfu DNA Polymerase
(*Pyrococcus furiosus*)

Artikel Nr.	Größe
E2730-01	200 Einheiten
E2730-04	500 Einheiten
E2730-02	1000 Einheiten
E2730-03	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 MgCl₂, 200 µM jeweils von dATP, dCTP, dGTP, dTTP (ein Gemisch aus unmarkiertem und [³H]-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 **Color Perpetual OptiTaq** 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 Color Perpetual OptiTaq DNA Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl; Spuren: 12 bis 20 kb: PCR-Amplifikation unter Verwendung von Puffer C mit 0.35 mM dNTPs und 1,25 U EURx Color Perpetual OptiTaq DNA Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

Die beigefügten Markierungsfarbstoffe bringen mehrere Vorteile:

- + optische Überprüfung, ob Polymerase zur Reaktion hinzugefügt wurde.
- + optische Kontrolle, ob die Reaktion vollständig durchmischt wurde.
- + dient als Markerfarbstoff für die Gelelektrophorese.
- + wirkt sich nicht negativ auf nachfolgende Arbeitsschritte aus wie Ligation, Transformation, automatisierte DNA-Sequenzierung, Restriktionsverdau. Ausnahme: Nicht geeignet für alle nachfolgenden Arbeitsschritte im Zusammenhang mit Absorptionsmessungen und Fluoreszenzanregung.

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.**

Perpetual OptiTaq DNA Polymerase ist eine Mischung von thermostabilen DNA-Polymerasen und zusätzlichen, die PCR unterstützenden Faktoren. Mit diesem Enzym können Produkte einer Länge von mehr als 20 kb Länge und hoher Genauigkeit amplifiziert werden. Das Enzym ist geeignet für die Synthese von DNA bei hohen Temperaturen. Dem Enzym sind zwei inerte Farbstoffe zugesetzt, die es ermöglichen, das PCR Produkt ohne Zusatz eines Gel-Ladepuffers auf ein Agarosegel aufzutragen.

Beschreibung:

- Color Perpetual OptiTaq DNA-Polymerase ist eine modifizierte und optimierte thermostabile Enzym-Mischung Sie besteht aus hochreinen *Thermus aquaticus* und *Pyrococcus furiosus* DNA-Polymerasen, einem sorgfältig ausgewählten monoklonalen AntiTaq - Antikörper und zusätzlichen, die PCR unterstützenden Faktoren.
- Color Perpetual OptiTaq DNA-Polymerase wird aus ultrareinen, rekombinanten Enzymen hergestellt.
- Der sorgfältig ausgewählte AntiTaq 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 Bildung von Komplexen zwischen der Taq DNA-Polymerase und einem antiTaq 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.
- Die Enzym-Mischung katalysiert in Gegenwart von Mg²⁺-Ionen den Einbau von Nucleotiden in Duplex DNA in 5'→3' Richtung. Der Enzymmix besitzt außerdem 3'→5' Korrekturleseaktivität (proofreading) und erzielt damit eine Genauigkeit, die beträchtlich über derjenigen unmodifizierter Taq DNA-Polymerase liegt (1).
- Ermöglicht über ein breites Spektrum verschiedenartiger PCR-Reaktionen eine erhöhte Ausbeute an PCR-Produkten im Vergleich zu reiner Taq DNA Polymerase.
- PCR-Produkte können sowohl einen -A Überhang (ca. 5% der Produkte) als auch stumpfe Enden (blunt ends) (ca. 95% der Produkte) besitzen. Somit sind im Anschluß sowohl TA- als auch Blunt- Klonierungsreaktionen möglich.
- Bestens geeignet für Multiplex-PCR, da Color Perpetual OptiTaq im Vergleich zu unmodifizierter Taq Polymerase eine breitere Toleranz gegenüber Mg²⁺ und Salz-Konzentrationen sowie dem pH-Wert des Reaktionsansatzes aufweist (2,3).
- Verbessert PCR-Ergebnisse von kritischen Vorlagen (templates), wie Regionen mit erhöhtem GC-Gehalt, Palindromen oder hoch repetitiven Sequenzbereichen.
- Die Anzahl der PCR-Zyklen kann verringert werden, da der Anteil unvollständig verlängerter PCR-Produkte deutlich reduziert ist.
- Erhöhte Ausbeute und erhöhte Produktgüte.
- Ideal für die genomische Sequenzierung und Lokalisierung von Genabschnitten (mapping), da der Zusammenbau von Contigs aus PCR-Produkten größerer Länge deutlich vereinfacht wird.
- Color Perpetual OptiTaq 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 mehr als 20 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, 50% (v/v) Glycerin.

10 x Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

10 x Pol Buffer A (Optimierungspuffer ohne MgCl₂):

Dieser Puffer enthält kein MgCl₂ und erlaubt die Optimierung der MgCl₂ - Konzentration.

10 x Pol Buffer B (generelle Anwendung, bis zu 8-10 kb):

Der Puffer enthält 15 mM MgCl₂ und ist für den Gebrauch mit 0.2 mM je dNTP optimiert.

10 x Pol Buffer C (für Produkte größer als 8-10 kb):

Der Puffer enthält 17.5 mM MgCl₂ und ist für den Gebrauch mit 0.35 mM je dNTP optimiert.

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. Cline, J., Braham, J. und Hogrefe, H. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24, 3546.
2. Chien, A., Edgar, D.B. und Trela, J.M. (1976) *J. Bacteriol.* 127, 1550.
3. Kaledin, A.S., Silusarenko, A.G. und Gorodetskii, S.I. (1980) *Biokhimiya* 45, 644.

Color Perpetual Opti*Taq* DNA Polymerase PCR PROTOCOL

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
10 x Pol Buffer A oder 10 x Pol Buffer B	5 µl	1x
50 mM MgCl ₂	1-5 µl bei Verwendung von 10 x Pol Buffer A oder 0 µl bei Verwendung von 10 x Pol Buffer B	1-5mM 1.5 mM
dNTP Mix (je 5mM)	2 µl bei Benutzung von 10 x Pol Buffer A oder 10 x Pol Buffer B	0.2 mM je dNTP
Vorwärts-Primer	Variabel	0.3-0.5 µM
Reverser Primer	Variabel	0.3-0.5 µM
ColorPerpetual Opti <i>Taq</i> DNA Polymerase, 1 U/µl	1.25µl	1.25 U
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	<0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Variabel	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

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-fach Puffer), da solche Lösungen im gefrorenen Zustand Konzentrationsgradienten bilden.
- Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der DNA Polymerasen zunächst durch den monoklonalen Antikörper reversibel inhibiert wird.
- 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 MgCl₂ in PCR-Reaktionen 1.5 mM (wie in Pol Buffer B bereitgestellt). Bei einer Konzentration von 0.35 mM je dNTP beträgt die Standard-Endkonzentration von MgCl₂ in PCR-Reaktionen 1.75 mM (wie in Pol Buffer C bereitgestellt). In den meisten PCR-Reaktionen werden mit diesen Konzentrationen zufriedenstellende Resultate erzielt. In einigen Fällen ist es jedoch notwendig, die optimale MgCl₂-Konzentration experimentell zu bestimmen. Für diesen Zweck ist Puffer A vorgesehen.
- Bei Verwendung von Color Perpetual Opti*Taq* DNA Polymerase können PCR-Reaktionen ohne nachträglichen Zusatz eines Auftragspuffers auf ein Gel geladen werden. Der Polymerase sind zwei inerte Farbstoffe beige (rot und gelb), die sich während der Elektrophorese auftrennen. Bezogen auf ein 1% (w/v) Agarosegel migriert der rote Farbstoff etwa auf der Höhe eines 600 bp DNA-Fragmentes, der gelbe Farbstoff wandert schneller als 20 bp und markiert somit die Front des Gels. Die meisten nachfolgenden Anwendungen werden von den Farbstoffen nicht beeinträchtigt (Ausnahme: Fluoreszenz-Methoden). Trotzdem lautet die Empfehlung, PCR-Produkte vor nachfolgenden enzymatischen Reaktionen aufzureinigen.
- Die empfohlene Menge an Color Perpetual Opti*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.
- Mindestens 0.75 U Color Perpetual Opti*Taq* DNA Polymerase müssen je 50 µl Reaktionsvolumen eingesetzt werden, um das PCR-Produkt direkt, ohne Ladepuffer, auf ein Agarosegel auftragen zu können.
- Die optimale Menge an Vorlagen ("Template"-) DNA-Molekülen beträgt etwa 10⁴ 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 10¹¹ Molekülen, 1 µg von *E. coli* genomischer DNA entspricht 2 x 10⁸ Molekülen, 1 µg von menschlicher genomischer DNA entspricht 3 x 10⁸ Molekülen.
- Für die Amplifikation langer PCR-Fragmente sollten folgende Mengen an Template-DNA eingesetzt werden: 50-100 ng humaner genomischer DNA, 0.1-10 ng von bakterieller, Plasmid- und Phagen-DNA.
- Es sollte sichergestellt sein, dass die Template-DNA von möglichst hoher Qualität ist. Nur Template-DNA mit hohem Molekulargewicht sollte als Kopiervorlage verwendet werden, wenn lange PCR-Amplikons vervielfältigt werden sollen (länger als 20-50 kb, abhängig von der Amplikon-Länge).
- Hochmolekulare, komplexe genomische DNA sollte bevorzugt bei 2°C bis 8°C gelagert werden, um Scherung durch Eiskristallbildung zu vermeiden. Zur Vermeidung von DNA-Scherung sollte auch das Vortexen genomischer DNA vermieden werden.
- Benutzen Sie für die Amplifikation langer PCR-Fragmente ausschließlich dünnwandige Plastik-Reaktionsgefäße mit einem Füllvermögen von 0.2 µl.

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) für Produkte einer Länge von 0.1 - 10 kb

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende Denaturierung	93-95°C	2-5 min	1
Denaturierung	93-95°C	15-30 s	25-35
Annealing	50-68°C	30 s	
Extension	72°C oder 68°C	1 min/1 kb	
Finale Extension	72°C oder 68°C	7 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	1

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) für Produkte einer Länge >10 kb

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende Denaturierung	92-94°C	2 min	1
Denaturierung	92-94°C	10-15 s	10
Annealing	60-68°C	30 s	
Extension	68°C	1 min/1 kb	
Denaturierung	92-94°C	10-15 s	15-25
Annealing	60-68°C	30 s	
Extension	68°C	1 min/1 kb + 20 s pro zusätzlichem Zyklus	
Finale Extension	68°C	7 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	1

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_m, die auf den Primer-Datenblättern angegeben werden. Die optimale Annealing-Temperatur kann ober- oder unterhalb des abgeschätzten T_m liegen. Als Startpunkt für weitere Optimierungen sollte die Annealing-Temperatur zunächst um 5°C unterhalb T_m gewählt werden.
- Um die Reaktionsspezifität zu erhöhen, besitzen Primer für die Amplifikation langer PCR-Fragmente typischerweise eine Länge von 22-34 bp und eine Annealing-Temperatur von mehr als 60°C.
- Sollen lange PCR-Fragmente erzeugt werden, sind die Denaturierungsschritte so kurz wie möglich zu halten. Versuchen Sie, einen einleitenden Denaturierungsschritt nicht länger als 2 min bei 94°C und eine Denaturierungszeit nicht länger als 10-15 s pro Zyklus zu wählen. In einigen Fällen benötigen Vorlagen ("Templates") mit hohem GC-Gehalt höhere Temperaturen, um vollständig zu denaturieren. Berücksichtigen Sie aber bitte, dass die Ausbeute steigt, wenn zeitliche Dauer und Temperatur des Denaturierungsschrittes möglichst gering gewählt werden.
- Für die Amplifikation von PCR-Produkten einer Länge von mehr als 5 kb wird empfohlen, eine Elongationstemperatur von 68°C zu wählen. Eine Elongationstemperatur von 68°C wird auch für die Amplifikation extrem AT-reicher (also GC-ärmer) Sequenzabschnitte empfohlen, beispielsweise für einige Bereiche des *Arabidopsis*-Genoms.
- Sollen PCR-Produkte einer Länge von mehr als 10 kb erzeugt werden, wird sehr empfohlen, mit Beginn des 11. Zyklus die Zeitdauer des Elongationsschrittes je Zyklus um 20 s zu erhöhen. Hierdurch wird kompensiert, dass der Enzymmix mit fortschreitender Amplifikationsdauer zunehmend an Aktivität verliert.