

Amplus DNA Polymerase

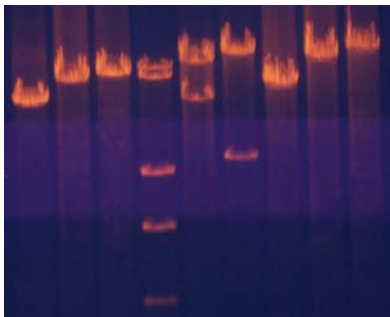
Thermus sp. DNA Polymerase
Pyrococcus sp. DNA Polymerase
 Polymerase Enhancing Factor

Artikel Nr.	Größe
E2900-01	100 Einheiten
E2900-02	500 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

Chromosomale DNA						Episomale DNA		
Humane DNA						Lambda DNA		
kb	kb	kb	M1	M2	M3	kb	kb	kb
18	22	24				20	30	40



PCR Amplifikation unter Verwendung von EURx Amplus DNA Polymerase.

Spuren 18, 22, 24 kb: PCR Reaktionen unter Verwendung von 2, 1.75 oder 1.5 U Amplus DNA Polymerase und 250-500 ng menschlicher, genomischer DNA. 35 Zyklen, Reaktionsvolumen 50 µl. Auf das 0.5% [w/v] Agarose-Gel wurden jeweils 3, 4 und 8 µl von 50 µl Gesamt-Reaktionsvolumen aufgetragen.

Marker-Gelspuren:

Lambda DNA (GenBank Acc.No. J02459)

Spur M1: Lambda DNA, geschnitten mit HindIII, 23, 9.5, 6.7, 4.4 kb.

Spur M2: Lambda DNA, geschnitten mit KpnI, 30, 17 kb.

Spur M3: Lambda DNA, geschnitten mit Apal, 38.5, 10 kb.

Spuren 20, 30, 40 kb: PCR Reaktionen unter Verwendung von 2 U Amplus DNA Polymerase und 5-20 ng Lambda-DNA als Vorlage (Template). 25 Zyklen, Reaktionsvolumen 50 µl. Auf das 0.5% [w/v] Agarose-Gel wurden jeweils 2, 2.5 und 4 µl von 50 µl Gesamt-Reaktionsvolumen aufgetragen.

Präparation geeigneter, langer DNA:

Ausreichend große humane genomische DNA zur Amplifikation sehr großer DNA-Fragmente wurde aus HeLa-Zellen extrahiert, mit Hilfe des EURx GeneMatrix Tissue DNA Purification Kit (Best. Nr. E3550).

Thermostabile DNA-Polymerase-Mischung zur Amplifikation sehr langer Amplikons (genomische DNA-Abschnitte länger als 25 kb und episomale DNA-Abschnitte bis zu 40 kb). Enthält eine sorgfältig aufeinander abgestimmte Mischung thermostabiler DNA Polymerasen, einen speziellen, die Polymerase unterstützenden Faktor und optimierte Puffer für die Synthese sehr langer Amplikons.

Beschreibung:

- Amplus DNA Polymerase ist eine modifizierte und optimierte Formulierung aus *Thermus sp.* und *Pyrococcus sp.* DNA Polymerasen und einem speziellen, die Polymeraseaktivität verstärkenden Faktor. Mit Hilfe dieses Faktors werden sowohl die Produktausbeute als auch die Fähigkeit maximiert, sehr lange Amplikate zu vervielfältigen.
- Hergestellt aus hochreinen, rekombinanten Enzymen.
- Durch die Zusammensetzung des Polymerase-Puffers wird sichergestellt, dass auch bei hohen Temperaturen genügend Pufferkapazität vorhanden ist, um den pH Wert auch bei der Amplifikation sehr langer DNA Fragmente stabil zu halten.
- Die Enzymformulierung erzeugt PCR-Amplikons einer Länge von 3 bis 25 kb aus genomischen DNA-Kopiervorlagen und aus episomalen Fragmenten bis zu 40 kb. Auch kleine Fragmente, beispielsweise einer Länge von 0.1 kb, werden zuverlässig vervielfältigt.
- Die Enzymformulierung ist besonders geeignet für die Amplifikation, Klonierung und Analyse eukaryotischer genomischer DNA.
- Besonders geeignet zur Kartierung und Sequenzierung von Genomen, da das Zusammenfügen eines Satzes einander überlappender DNA-Fragmente (Contigs) durch Verwendung sehr langer Amplifikationsprodukte stark erleichtert wird.
- Ermöglicht die direkte Charakterisierung von sehr langen klonierten Sequenzabschnitten in Lambda-Phagen und Kosmiden.
- Verbessert die PCR-Amplifikation aus kritischen DNA-Kopiervorlagen, wie beispielsweise aus Sequenzabschnitten mit hohem GC-Gehalt.
- Amplus DNA Polymerase besitzt 3' → 5' Korrekturleseaktivität ("proofreading") und somit erhöhte Genauigkeit im Vergleich zu *Taq* DNA-Polymerase.
- Besitzt 5' → 3' Exonukleaseaktivität.
- PCR-Produkte besitzen zum einen Teil einen -A Überhang, zum anderen Teil stumpfe Enden (blunt ends). Somit sind im Anschluß sowohl TA- als auch Blunt-Klonierungsreaktionen möglich.

Lagerungspuffer (Storage 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:

10 x Amplus Puffer:

Der Puffer enthält 26 mM MgSO₄ und ist optimiert für eine dNTP - Konzentration von 2 mM (0.5 mM je dNTP).

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.

Amplus DNA Polymerase PCR PROTOKOLL

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
10 x Amplus Buffer (enthält 26 mM MgSO ₄)	5 µl	1x
dNTP Mix (5mM je dNTP)	5 µl	0.5 mM je dNTP
Vorwärts-Primer	Variabel	0.3 µM
Reverser Primer	Variabel	0.3 µM
Amplus DNA Polymerase, 5 U/µl		
(a) Genomische Ziel-DNA bis 20 kb und episomale Ziel-DNA bis 40 kb	0.4 µl	2 U
(b) Genomische Ziel-DNA größer als 20 kb	0.3 - 0.35 µl	1.5 - 1.75 U
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	<0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Variabel	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) für Produkte einer Länge von 0.1 bis 5 kb

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende Denaturierung	92-94°C	2 min	1
Denaturierung	92-94°C	10 s	25-35
Annealing	60-68°C	30 s	
Extension	68°C	1 min/1 kb	
Finale Extension	68°C	7 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	1

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) für Produkte einer Länge >5 kb

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende Denaturierung	92-93°C	2 min	1
Denaturierung	92-93°C	10 s	10
Annealing	60-68°C	30 s	
Extension	68°C	1 min/1 kb	
Denaturierung	92-93°C	10 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:

- 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 sollten auf Eis pipettiert werden.
- Um die Bildung von Primer-Dimeren zu minimieren, wird empfohlen, die PCR Reaktionen in einen PCR Cycler zu stellen, dessen Block auf die Denaturierungstemperatur vorgeheizt wurde.
- Bei einer dNTP Konzentration von 0.5 mM je dNTP beträgt die Standardkonzentration von MgSO₄ für Amplus DNA Polymerase basierte PCR-Reaktionen 2.6 mM (wie bei Verwendung des Amplus Puffers bereitgestellt). In den meisten Fällen werden mit dieser Konzentration gute Ergebnisse erzielt. Wenn höhere Mg²⁺-Konzentrationen benötigt werden, sollte die beiliegende 25 mM MgSO₄ Stammlösung verwendet werden.
- Die empfohlene Menge an Amplus DNA Polymerase pro Reaktion beträgt 2 U je 50 µl PCR-Reaktionsvolumen. Für **genomische Ziel-DNA einer Länge von mehr als 20 kb sollten 1.5 bis 1.75 U statt 2 U je 50 µl Reaktionsvolumen** eingesetzt werden. In einzelnen Fällen (besonders bei sehr langen Amplikons über 18 bis 20 kb Länge) kann es notwendig sein, die Enzymkonzentration zu optimieren, um beste Ausbeuten zu erhalten.
- Die empfohlene Primer-Konzentration für die PCR-Reaktion beträgt 0.3 µM. Diese Konzentration ermöglicht gute Ausbeuten, ohne dass die Spezifität der Amplifikation bei genomischen DNA-Vorlagen beeinträchtigt wird. Eine Erhöhung der Primer-Konzentration auf 0.4 bis 0.5 µM erhöht zwar die Ausbeute, verringert allerdings die Spezifität der Reaktion.
- Die empfohlene Menge an DNA-Kopiervorlage ("Template") beträgt für PCR-Reaktionen über lange Distanzen: 100 - 500 ng humaner genomischer DNA, 0.1 - 10 ng bakterieller DNA, 1 - 50ng Phagen-DNA und 1 - 20 ng Plasmid-DNA.
- Die Qualität der DNA-Vorlagen ("Templates") besitzt einen dramatischen Einfluss auf die Performanz der PCR. Es sollte sichergestellt werden, dass die DNA-Vorlage von ausreichend hoher Qualität ist. Wenn PCRs über lange Distanzen durchgeführt werden, sollte nur sehr reine DNA mit hohem Molekulargewicht als Ausgangsmaterial verwendet werden (höher als 20 bis 50 kb, je nach Länge des Amplikons). Bei Isolierung und Reinigung der DNA-Vorlagen sollte besondere Sorgfalt darauf verwendet werden, nur sehr schonende Methoden zu verwenden, um ein Scheren der hochmolekularen DNA zu vermeiden.
- Eine Lösung komplexer genomischer DNA sollte bei +2 bis +8°C gelagert und nicht gefroren werden, da die Bildung von Eiskristallen zur Scherung der DNA beiträgt. Entsprechend sollten das Vortexen und jegliche Gefrier-Auftauschritte der DNA-Lösungen vermieden werden.
- PCR-Reaktionen für lange Amplikons sollten nur in dünnwandigen 0.2 µl PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt werden.
- Es ist meistens nicht notwendig, Additive oder "Enhancer" zu den PCR-Reaktionen hinzu zu fügen. Lediglich für einige, schwierige DNA-Vorlagen, wie GC-reiche Reaktionen und sehr lange Ziel-DNA-Abschnitte über 30 kb Länge kann die Zugabe von Additiven wie DMSO einen positiven Einfluss auf den Verlauf der PCR-Reaktion nehmen.

Hinweise:

- Die Annealing-Temperatur sollte für jedes Primerpaar optimal angepasst werden. Ausgangspunkt sind die Schmelztemperaturen T_m, die auf den Primer-Datenblätter 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 Reaktionspezifität 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. **Für die Amplifikation genomischer DNA-Vorlagen mit einer Amplikon-Länge von mehr als 15 kb wird eine Denaturierungstemperatur von nicht mehr als 92°C sehr empfohlen.** Genomische DNA ist deutlich empfindlicher gegenüber Strangbrüchen als episomale DNA. In einigen Fällen benötigen DNA-Kopiervorlagen ("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 zwischen 5 und 10 kb wird empfohlen, wird sehr empfohlen, mit Beginn des 11. Zyklus die Zeitdauer des Elongationsschrittes je Zyklus um 20 s zu erhöhen. Ab einer Amplikon-Länge von 10 kb ist die Elongation der Extension um 20 s pro Zyklus zwingend notwendig, um bei fort schreitender Reaktionsdauer der Abnahme von Enzymaktivitäten entgegenzuwirken und um in Folge zufriedenstellende Resultate zu erzielen.