



Perpetual Taq Master Mix (2x)

PCR System mit monoklonalem Antikörper für automatisierten "Hot Start"

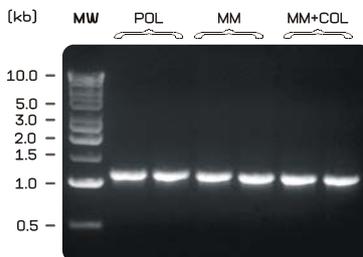
Perpetual Taq Master Mix (2x) (Taq DNA Polymerase)

Artikel Nr.	Größe
E2740-01	100 Reaktionen je 50 µl
E2740-04	200 Reaktionen je 50 µl
E2740-02	500 Reaktionen je 50 µl

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 (langfristig, mehr als 12 Monate haltbar) oder bei +4°C bis zu zwei Monate.



PCR Amplifikation unter Verwendung von EURx Perpetual Taq PCR Master Mix (2x).

Ein Amplikon einer Länge von 1.1 kb (humanes CCR5 Gen) wurde mit nicht vorgemischter Perpetual Taq DNA Polymerase und mit Perpetual Taq Master Mix vervielfältigt.

Spur MW: Molekulargewichtsmarker-Perfect 1 kb DNA Ladder (Best. Nr. E3130).

Spur POL (1,2): PCR-Amplifikationsreaktion mit 1.25 U Perpetual Taq DNA Polymerase, Pol Buffer B und dNTPs

Spur MM (3,4): PCR-Amplifikationsreaktion mit Perpetual Taq PCR Master Mix (2x), nach 25 Gefrier-/Auftau-Zyklen.

Spur MM+COL (5,6): PCR-Amplifikationsreaktion mit Perpetual Taq PCR Master Mix (2x) und 10 x Color Load, nach 25 Gefrier-/Auftau-Zyklen.

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 Taq DNA Polymerase Master Mix, mit stabiler und reproduzierbarer Amplifikationsleistung auch nach mehr als 25 Gefrier-/Auftau-Zyklen und 12-monatiger Lagerung. Vorkomplexiert mit einem hochwertigen, spezifischen monoklonalen Anti-Taq Antikörper für automatisierbaren "Hot Start".

Beschreibung:

- Perpetual Taq PCR Master Mix (2x) ist eine gebrauchsfertig abgestimmte Mischung aus Perpetual Taq DNA Polymerase, optimiertem Reaktionspuffer, MgCl₂ und dNTPs.
- Spart Zeit, erhöht die Reproduzierbarkeit (durch Minimierung von Kalkulations- und Pipettierfehlern) und reduziert das Risiko von Kontaminationen (wegen Verminderung der Pipettierschritte) während der PCR-Vorbereitung.
- Die Amplifikationsleistung ist identisch zu reiner Perpetual Taq DNA Polymerase (Best. Nr. E2500). Zusätzlich werden Aliquots reinen, nukleasefreien Wassers mitgeliefert. PCRs werden ohne das Risiko des DNA-Eintrages durch kontaminiertes Wasser angesetzt.
- Perpetual Taq besteht aus Taq DNA-Polymerase, die reversibel an einen monoklonalen anti-Taq Antikörper gebunden ist. Die Replikationsaktivität des Enzyms ist für die Zeitspanne bis zum ersten Denaturierungsschritt blockiert - wichtig, um Produkte unspezifischer Primerextensionen wie Primer-Dimere zu verhindern. Ermöglicht das bequeme Zusammenpipettieren von PCR - Reaktionen bei Raumtemperatur.
- Der monoklonale anti-Taq Antikörper denaturiert erst bei einer Temperatur von 70°C irreversibel und besitzt somit hohe thermische Stabilität.
- 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.
- "Hot Start" PCR kann PCR-Spezifität, Ausbeute und Empfindlichkeit im Vergleich mit herkömmlichen PCR-Reaktionen erhöhen.
- Sowohl die erhöhte Spezifität als auch die Reduktion fehlerhafter Primerbindung (mispriming) verbessern die Qualität der Multiplex-PCR.
- Repliziert DNA bei 72°C (bzw. mit verminderter Geschwindigkeit auch bei niedrigeren Temperaturen). Die Halbwertszeit bei 95°C beträgt 40 min (1,2).
- 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.

Perpetual Taq PCR Master Mix (2x), Packungsinhalt:

1. Perpetual Taq PCR Master Mix (2x)
2. PCR-Wasser, nukleasefrei
3. 10 x Color Load Puffer

Perpetual Taq PCR Master Mix (2x):

Der Mix enthält 2 x Pol Buffer B mit 3 mM MgCl₂ und 0.4 mM je dNTP. Finale Konzentrationen: 1.5 mM MgCl₂ und 0.2 mM je dNTP.

10 x Color Load:

10 x Color Load enthält zwei Farbstoffe und eine Gel-Schwerelösung. Mit diesem Puffer werden Aliquots der PCR-Reaktion direkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, 3'-Exonuklease-, sowie einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt, dass typische Präparationen zu mehr als 95 % rein sind.

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 PCR Master Mix (2x) PCR PROTOKOLL

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
Perpetual Taq PCR Master Mix (2x)	25 µl	1.25 U Perpetual Taq DNA Polymerase 1 x Reaktionspuffer (1.5 mM MgCl ₂) 0.2 mM je dNTP
Vorwärts-Primer	Variabel	0.1-0.5 µM
Reverser Primer	Variabel	0.1-0.5 µM
Optional: 10x Color Load	5 µl	1 x
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	<0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Auf 50 µl	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm):

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende 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:

- Konzentrationsunterschiede vermeiden:** Perpetual Taq PCR Master Mix (2x) vollständig auftauen, vorsichtig vortexen und kurz anzentrifugieren, um lokale Unterschiede in der Salzkonzentration zu vermeiden.
- Raumtemperatur:** Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der Taq DNA Polymerase zunächst durch den monoklonalen Antikörper reversibel inhibiert wird.
- Primermix:** Primer separat oder als Primermix zufügen.
- Proben mischen:** Kurz vortexen und anzentrifugieren.
- Zyklus nicht vorheizen:** Ein Vorheizen des Thermocycler-Blocks auf 94-95°C vor Hineinstellen der PCR-Reaktionsansätze ist - im Unterschied zu Nicht-"HotStart" DNA Polymerasen - nicht notwendig.
- MgCl₂:** Die Standard-Endkonzentration von MgCl₂ in PCR-Reaktionen beträgt 1.5 mM (wie in 1 x Perpetual Taq PCR Mastermix enthalten) - für die meisten PCR Reaktionen optimal. Wenn höhere MgCl₂ Konzentrationen benötigt werden, sollte eine 25 mM MgCl₂ Stammlösung hergestellt werden (kann bei Bestellung bei uns angefordert werden). 1 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung fügt 25 nmol zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die MgCl₂-Konzentration einer 50 µl Reaktion um 0.5 mM.
- Farbiger Ladepuffer:** Der 10x Color Load Puffer ermöglicht, Aliquots von PCR Reaktionen direkt auf ein Agarose-Gel aufzutragen - ohne Verwendung eines Ladepuffers. Enthalten sind zwei elektrophoretisch trennbare Farbstoffe (rot und gelb) sowie Gel-Schwerelösung. In einem 1 % [w/v] Agarose-Gel migriert der rote Farbstoff in Höhe von 600 bp, der gelbe Farbstoff schneller als 20 bp. Obwohl die Farbstoffe anschließende enzymatische Reaktionen meist nicht beeinflussen, schadet es nicht, die PCR-Produkte vor nachfolgenden Reaktionen aufzureinigen.
- Kopienzahl DNA-Vorlage:** 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 10⁹ Molekülen, 1 µg von menschlicher genomischer DNA entspricht 3 x 10⁵ Molekülen.
Generische Formel zur Berechnung der Anzahl an Genen / Genomen aus der DNA-Masse:
Anzahl Kopien [Moleküle] = (DNA Masse [ng] x 6.022 x 10²³ [Moleküle mol⁻¹]) / (Länge [bp] x 1x10⁹ [ng g⁻¹] x 616 [g bp⁻¹])
(MW pro bp: siehe Dolezel et al. Cytometry, 2003, Vol. 51A, 2, 127-8)

Hinweise:

- Initiale Denaturierung:** Eine einleitende Denaturierung von 2 min Dauer ist zwingend notwendig, um den Antikörper zu denaturieren und die Aktivität der DNA Polymerase wieder herzustellen.
- Primerbindung:** Die Primerbindungs (Annealing-) Temperatur sollte auf jedes Primerpaar optimal angepasst werden. Ausgangspunkt sind auf den Primer-Datenblättern angegebene Schmelztemperaturen T_m. Die optimale Annealing Temperatur kann ober- oder unterhalb des abgeschätzten T_m liegen. Als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen die Annealing-Temperatur zunächst um 5°C unterhalb T_m wählen.
- Lange PCRs:** 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-armen) Sequenzabschnitte empfohlen, beispielsweise für einige Bereiche des *Arabidopsis*-Genoms.