



TITAQ

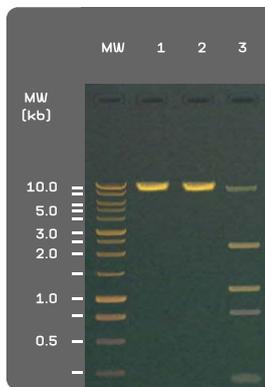
tiTaq DNA Polymerase

PCR System für automatisierten "Hot Start"

Taq DNA Polymerase (*Thermus aquaticus*)

Artikel Nr.	Größe
E2715-01	200 Einheiten
E2715-04	500 Einheiten
E2715-02	1000 Einheiten
E2715-03	5000 Einheiten

Lagerbedingungen:
Lagerung bei -20°C



PCR Amplifikation unter Verwendung von EURx tiTaq DNA-Polymerase.

Ein 6.9 kb-Fragment aus *Bacillus* Phagen-DNA wurde mit EURx tiTaq DNA Polymerase amplifiziert.

Zur Demonstration des unspezifischen Primings und der Synthese von unspezifischen Nebenprodukten unter Nicht-"HotStart"-Bedingungen wurden die PCR-Reaktionen vor PCR-Amplifikation bei 25°C für 30 min inkubiert. Zuverlässiger "HotStart" ist gewährleistet, wenn nur ein einziges Produkt einer Länge von 6.9 kb synthetisiert wird.

Spur M: Molekularer Größenmarker EURx Perfect™ 1 kb plus Leiter (E3131-02).

Spuren 1, 2: PCR-Amplifikation mit 1.25 U EURx tiTaq DNA Polymerase in Puffer B mit 0.2 mM dNTPs in einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

Spur 3: PCR-Amplifikation mit 1.25 U EURx Taq DNA Polymerase (nicht "HotStart") in Puffer B mit 0.2 mM dNTPs in einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

Enzymeigenschaften:

Eigenschaft	Wert
Vorlage (Template)	ssDNA, dsDNA, (RNA)
5'-3' Exonuklease	ja
3'-5' Exonuklease	nein
Korrekturleseaktivität ("Proofreading")	nein
5'-DNA-Strangersetzung	nein
Fehlerrate	>10 ⁻⁶
Relative Fehlerrate* (Taq = 1)	1
Halbwertszeit bei 95°C	40 min
Amplikonlänge	bis 10 kb
Anhängen von A an 3'-Termini	ja (ein Teil aller Amplikons)
TA- / "Blunt" Klonierung	ja / ja

*Relative Fehlerrate := Fehlerrate tiTaq / Taq (rekombinant). Ein Wert von 10 bedeutet 10-fach höhere Genauigkeit im Verhältnis zu Taq, ein Wert von 1 zeigt identische Genauigkeit an.

Thermostabile, rekombinante Taq DNA-Polymerase für automatische "hot start" PCR. Vorkomplexiert mit einem spezifischen, temperaturabhängigen Inhibitor. Wirtschaftliche Alternative zu Antikörper-vermitteltem "HotStart".

Beschreibung:

- Hochreine, rekombinante tiTaq DNA Polymerase ist ein "HotStart" PCR Enzym. Die Blockierung der Polymeraseaktivität erfolgt nicht per Antikörper. tiTaq ermöglicht das Zusammenfügen von PCR-Reaktionskomponenten bei Raumtemperatur.
- Die Bildung von Komplexen zwischen Taq DNA Polymerase und dem temperaturabhängigen Inhibitor blockiert bei Raumtemperatur die Restaktivität der Polymerase. Unerwünschte, unspezifische Primerextension, gefolgt von Primer-Dimerbildung während der ersten PCR-Zyklen wird verhindert, insbesondere während der ersten Temperaturrampe von Raumtemperatur auf 95°C.
- Bei Raumtemperatur blockierte DNA Polymerase-Aktivität wird unter regulären PCR-Bedingungen wieder hergestellt.
- Ein erneutes Öffnen der Reaktionsgefäße nach bereits erfolgter Denaturierung bei 95°C zur Zugabe von DNA Polymerase entfällt. Hierdurch sinkt das Risiko von Kreuzkontaminationen und sichere Laborpraxis wird gewährleistet.
- Die zuverlässige, hohe Stabilität des Taq-Inhibitor-Komplexes bei niedrigen Temperaturen führt zu einer enormen Zunahme im Hinblick auf PCR-Spezifität, Ausbeute und Empfindlichkeit im Vergleich zu 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 Nucleotiden 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).
- Empfohlen für PCR-Reaktionen und Primerextensionen bis zu 10 kb Produktlänge.

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, die erforderlich ist, um 10 nmol Deoxyribonucleotide 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.

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

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

10 x Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

10 x Pol Buffer A (Optimierungspuffer ohne MgCl₂):

Dieser Puffer enthält kein MgCl₂ und erlaubt die vollständige Optimierung der Mg²⁺-Konzentration, auch für Mg²⁺-Endkonzentrationen kleiner 1.5 mM.

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

Der 10x-Puffer enthält 15 mM MgCl₂ und ist für den Gebrauch mit 0.1 - 0.2 mM je dNTP optimiert.

Die Mg²⁺-Konzentration kann für Endkonzentrationen größer als 1.5 mM optimiert werden..

10 x Pol Buffer C (gefärbt):

Dieser Puffer entspricht in der Zusammensetzung dem Puffer B (Mg²⁺-Endkonzentration 1.5 mM), 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.

Die Mg²⁺-Konzentration kann für Endkonzentrationen größer als 1.5 mM optimiert werden..

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.



tiTaq DNA Polymerase

„HOT START“ PCR PROTOKOLL

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
10 x Pol Buffer A oder 10 x Pol Buffer B oder 10 x Pol Buffer C	5 µl	1x
25 mM MgCl ₂	2 - 10 µl bei Verwendung von 10 x Pol Buffer A oder 0 - 7 µl bei Verwendung von 10x Pol Buffer B oder C	1 - 5 mM 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
tiTaq DNA Polymerase, 2.5U/µl	0.5 µl	1.25 U
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	<0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Variabel	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

Generische Formel zur Berechnung der Kopienanzahl von Vorlagen-DNA-Molekülen ("Template DNA") aus der Gesamt-DNA-Menge:

$$\text{Kopienanzahl Vorlagen-DNA [Moleküle]} =$$

$$\frac{\text{DNA Menge [ng]} \cdot 6.022 \times 10^{23} \left[\frac{\text{Moleküle mol}^{-1}}{\text{g mol}^{-1}} \right]}{\text{Genomische DNA Länge [kb]} \cdot 616 \left[\frac{\text{g mol}^{-1} \text{bp}^{-1}}{10^9 \left[\frac{\text{ng g}^{-1}}{\text{bp}^{-1}} \right]} \right]} \cdot \frac{10^{-3} \left[\frac{\text{kb bp}^{-1}}{\text{g}^{-1}} \right]}{10^9 \left[\frac{\text{ng g}^{-1}}{\text{bp}^{-1}} \right]}$$

Optimal: 10⁴ Kopien der DNA-Vorlage
Maximal: 0,5 µg DNA oder weniger

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm):

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

Hinweise:

- Erster Hauptsatz der PCR.** PCR ist vergleichbar mit homöopathischen Prozessen. Sie funktioniert am besten, solange *alle* Komponenten nur in homöopathischen Dosen eingesetzt werden. "Viel hilft viel" gilt nicht für PCR. Außerhalb ihrer Spezifikationsgrenzen im Überschuss eingesetzt, kann jede der Komponenten die PCR-Reaktion inhibieren.
- Konzentrationsunterschiede vermeiden.** 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.
- Ansatz bei Raumtemperatur.** Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der Taq DNA Polymerase zunächst durch den monoklonalen Antikörper reversibel inhibiert wird. Gut mischen.
- Zyklus vorheizen nicht erforderlich.** 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 Pol Puffer B bereitgestellt) - für die meisten PCR Reaktionen optimal. In den meisten PCR Reaktionen werden mit dieser Konzentration zufriedenstellende Resultate erzielt. In einigen Fällen ist es jedoch notwendig, die optimale MgCl₂-Konzentration experimentell zu bestimmen. 1 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung fügt 25 nmol zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die Mg²⁺-Konzentration einer 50 µl Reaktion um 0.5 mM. Erhöhung der Mg²⁺-Konzentration erhöht die PCR-Ausbeute, aber vermindert die Reaktionsspezifität (mehr Banden, aber auch mehr unerwünschte Banden werden amplifiziert). Verminderung der Mg²⁺-Konzentration führt zu niedriger PCR-Ausbeute, aber erhöht die Spezifität der Reaktion.
- Integrierter farbiger Ladepuffer.** 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.
- Enzymmenge tiTaq.** Die empfohlene Menge an tiTaq 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.
- PCR Enhancer.** In den meisten Fällen ist es nicht notwendig, die PCR-Reaktionsansätze mit Additiva zu ergänzen. Für die Vervielfältigung einiger schwieriger Vorlagen wie GC-reiche Sequenzen oder DNA-Abschnitte mit komplexen Sekundärstrukturen kann den Ansätzen DMSO beigemischt werden. Empfohlene DMSO - Konzentrationen sind 2-8% [v/v], wobei (falls notwendig) 3% [v/v] einen guten Startwert darstellt.
- 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 9.8 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. Zu hohe Mengen eingesetzter Vorlagen-DNA (> 0,5 µg) können die PCR-Ausbeute beeinträchtigen bzw. die PCR-Reaktion inhibieren.

Hinweise:

- Primerbindungstemperatur:** 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.
- 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-ärmer) Sequenzabschnitte empfohlen, beispielsweise für einige Bereiche des *Arabidopsis*-Genoms.