



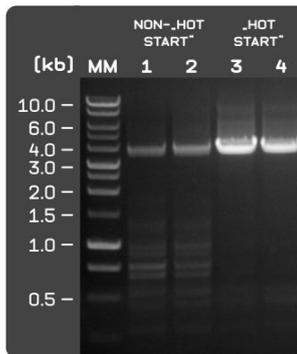
# TI Opti Taq DNA Polymerase

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

Artikel Nr.	Größe
E2725-01	100 Einheiten
E2725-04	500 Einheiten
E2725-02	1000 Einheiten
E2725-03	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 tiOpti Taq DNA Polymerase – Demonstration des Einflusses von "HotStart" auf PCR-Spezifität und PCR-Ausbeute.

Ein PCR-Amplikon von 4 kb Länge wurde mit EURx Opti Taq (kein "Hot Start"-Enzym) und mit EURx tiOpti Taq ("Hot Start"-Enzym) amplifiziert. PCR-Bedingungen: je 1.25 U DNA Polymerase, 10 x PCR-Puffer B, 0.2 mM dNTPs in 50 µl Reaktionsvolumen. Um die Auswirkung von "Hot Start" auf PCR-Spezifität und -Ausbeute zu demonstrieren, wurden die Reaktionen für 30 min bei 25°C inkubiert, bevor der PCR-Lauf gestartet wurde.

**MM:** EURx PerfectPlus 1 kb DNA Ladder (E3131)

**Spuren 1, 2:** PCR-Reaktionen mit 1.25 U Opti Taq DNA Polymerase (E2600, kein "Hot Start")

**Spuren 3, 4:** PCR-Reaktionen mit 1.25 U tiOpti Taq DNA Polymerase (E2600, "Hot Start").

**"HotStart" Mischung thermostabiler DNA-Polymerasen und PCR-unterstützender Faktoren.** Die Polymeraseaktivität ist bei Raumtemperatur durch einen temperaturabhängigen Inhibitor blockiert. Erlaubt die Synthese von Amplikons einer Länge von mehr als 20 kb Länge mit hoher Stringenz, Ausbeute und Genauigkeit.

### Beschreibung:

- "HotStart" PCR-Enzymmix, wird bei moderaten Temperaturen mittels eines temperaturabhängigen Inhibitors (TI) blockiert. Damit ist es möglich, PCR-Assays bei Raumtemperatur zusammenzufügen. Nach Erhitzen wird die Polymeraseaktivität unter den Temperaturbedingungen der PCR-Assays vollständig freigesetzt.
- tiOpti Taq DNA Polymerase ist eine modifizierte und optimierte Formulierung aus *Thermus aquaticus* und *Pyrococcus sp.* DNA Polymerasen sowie speziellen, die Polymeraseaktivität verstärkenden Faktoren.
- Hergestellt aus hochreinen, rekombinanten Enzymen.
- tiOpti Taq ermöglicht eine deutliche Steigerung der PCR-Spezifität, Sensitivität und Ausbeute im Vergleich zu konventioneller PCR..
- Die Enzym-Mischung katalysiert in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>-Ionen den Einbau von Nukleotiden 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.
- Ermöglicht höhere Ausbeuten im Vergleich zu konventioneller PCR mit Taq DNA Polymerase. Verbessert die PCR-Amplifikation aus kritischen DNA-Kopiervorlagen, wie beispielsweise aus Sequenzabschnitten mit hohem GC-Gehalt.
- tiOpti Taq 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 eignen sich die Amplikons sowohl für TA- als auch für Blunt- Klonierungsreaktionen möglich.

### Lagerungspuffer (Storage 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:

#### 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 8-10 kb):

Der Puffer enthält 15 mM MgCl<sub>2</sub> und ist für den Gebrauch mit 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.



# TI Opti Taq DNA Polymerase PCR PROTOKOLL (1)

## Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
10 x Pol Buffer A oder 10 x Pol Buffer B oder 10 x Pol Puffer C	5 µl	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2-10 µl bei Verwendung von 10 x Pol Buffer A oder  0-7 µl bei Verwendung von 10 x Pol Buffer B oder C	1-5mM  1.5-5 mM
dNTP Mix (je 5 mM)	2 µl	0.2 mM je dNTP
Vorwärts-Primer	Variabel	0.3-0.5 µM
Reverser Primer	Variabel	0.3-0.5 µM
tiOpti Taq DNA Polymerase, 2.5 U/µl	0.5 µl	1.25 U
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	< 0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Variabel	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

## Hinweise:

- 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 facher Puffer), da solche Lösungen im gefrorenen Zustand Konzentrationsgradienten bilden.
- Raumtemperatur.** Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der DNA Polymerase durch den temperaturabhängigen Inhibitor (TI) bei Raumtemperatur inhibiert wird. Gut mischen!
- Kein vorgeheizter PCR-Block erforderlich.** Wegen des "HotStart" TI-Inhibitors ist es nicht notwendig, die PCR-Reaktionen in einen vorgeheizten PCR-Block zu stellen..
- MgCl<sub>2</sub>.** Bei einer dNTP Konzentration von 0.5 mM je dNTP beträgt die Standardkonzentration von MgCl<sub>2</sub> für tiOpti Taq DNA Polymerase basierte PCR-Reaktionen 1.5 mM (wie bei Verwendung des tiOpti Taq Puffers bereitgestellt). In den meisten Fällen werden mit dieser Konzentration gute Ergebnisse erzielt. Manchmal kann die Reaktion optimiert werden, indem die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration optimiert wird. Wenn höhere Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen benötigt werden, sollte die beiliegende 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung verwendet werden. 1 µl einer 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung fügt 25 nmol MgCl<sub>2</sub> zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration einer 50 µl Reaktion um 0.5 mM.
- Puffer C für direkte Gelbeladung.** 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-Schwererlösung 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.
- DNA Polymerase-Menge.** Die empfohlene Menge an tiOpti 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 gute Resultate werden erzielt. In einigen Fällen kann es erforderlich sein, die Enzymmenge zu optimieren, um beste Ausbeuten zu erhalten.
- PCR-Additiva.** 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 Additiva wie DMSO einen positiven Einfluss auf den Verlauf der PCR-Reaktion nehmen. Sinnvolle Konzentrationsbereiche für DMSO sind 2%-8% [v/v], die empfohlene Anfangskonzentration (falls überhaupt erforderlich) beträgt 3% [v/v]
- Vorlagen-DNA-Menge.** 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 dsDNA 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.
- Vorlagen-DNA-Menge - Lange Amplifikate.** Die empfohlene Menge an DNA-Kopiervorlage ("Template") beträgt für PCR-Reaktionen über lange Distanzen: 50-500 ng humaner genomischer DNA, 0.1-10 ng bakterieller DNA, 1-50 ng Phagen-DNA oder 1-20 ng Plasmid-DNA.
- Vorlagen-DNA-Qualität.** Die Qualität der DNA-Vorlagen ("Templates") besitzt einen großen 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.
- Lagerung hochmolekularer DNA.** 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. Das Vortexen wie auch jegliche Gefrier-Auftauschritte der DNA-Lösungen sollten vermieden werden.
- Dünnwandige Reaktionsgefäße.** PCR-Reaktionen für lange Amplikons sollten nur in dünnwandigen 0.2 ml PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt werden.



## TI Opti Taq DNA Polymerase PCR PROTOKOLL (2)

### Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) für Produkte einer Länge von 0.1 bis 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 PCR-Produkte einer Länge von 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 zusätzl. Zyklus	
Finale Extension	68°C	7 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	1

### Hinweise:

- Einleitende Denaturierung.** Eine einleitende Denaturierung von 2 min Dauer bei 92°C-95°C ist zwingend erforderlich, um den temperaturabhängigen Inhibitor freizusetzen und die Aktivität der DNA Polymerase wieder herzustellen.
- Primerbindung.** 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 - Primerspezifikationen.** Um die Reaktionspezifität zu erhöhen, besitzen Primer für die Amplifikation langer PCR-Fragmente typischerweise eine Länge von 22-34 bp und eine Annealing-Temperatur höher als 60°C.
- Lange PCRs - Denaturierungsparameter.** Sollen lange PCR-Fragmente erzeugt werden, sind die Denaturierungsschritte so kurz wie möglich zu halten. Der einleitende Denaturierungsschritt sollte für lange Amplifikate nicht länger als 2 min bei 94°C und die Denaturierungszeit nicht länger als 10-15 s pro Zyklus betragen. 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 sowohl die zeitliche Dauer als auch die Temperatur des Denaturierungsschrittes möglichst gering gewählt werden.
- Lange PCRs - niedrige Elongationstemperatur.** 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-armen) Sequenzabschnitte empfohlen, beispielsweise für einige Bereiche des *Arabidopsis*-Genoms.
- Lange PCRs - Elongationsdauer.** 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.