

Polymerase X

TI Hybrid DNA Polymerase

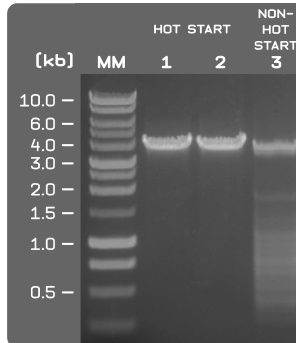


TI Hybrid DNA Polymerase

Artikel Nr.	Größe
E2940-01	100 Einheiten
E2940-02	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.



PCR Amplifikation unter Verwendung von EURx tiHybrid DNA Polymerase - Demonstration des Einflusses von "HotStart" auf PCR-Spezifität und PCR-Ausbeute.

Ein PCR-Amplikon von 4 kb Länge aus dem Gen für humanes beta-Globin wurde mit EURx Hybrid (Nicht-"Hot Start"-Variante) und mit EURx tiHybrid ("Hot Start"-Variante) amplifiziert. 10 x Hybrid Buffer, 0.2 mM dNTPs in einem Volumen von 50 µl. Um die Auswirkung von "Hot Start" auf PCR-Spezifität und PCR-Ausbeute zu demonstrieren, wurden vor Start des PCR-Laufes die "HotStart"-Reaktionen (Spur 1,2) und die Nicht-"HotStart" Reaktionen (Spur 3, 4) für 30 min bei 25°C inkubiert.

MM: Molekulargewichtsmarkierung - EURx Perfect Perfect Plus 1 kb DNA Ladder (E3134)

Spuren 1, 2: PCR-Reaktionen mit 1 U TiHybrid DNA Polymerase (E2940, "Hot Start")

Spur 3: PCR-Reaktionen mit 1 U Hybrid DNA Polymerase (E2950, kein "Hot Start").

Sehr schnelle und robuste thermostabile, synthetische DNA Polymerase mit hoher Genauigkeit ("proofreading") und optimierter Template-DNA Bindung. Entwickelt für automatisierte "HotStart" PCR, Für die effiziente und exakte Synthese von genomischen DNA-Vorlagen bis 12 kb und episomalen Templates bis 20 kb.

Beschreibung:

- tiHybrid DNA Polymerase ist eine Mischung aus der hochoptimierten X Hybrid DNA Polymerase und einem temperaturabhängigen Inhibitor (TI) für automatisierten "Hot Start". Die Enzymaktivität ist bei moderaten Temperaturen blockiert. PCR Reaktionen können bei Raumtemperatur zusammengefügt werden. Die Polymerase-Aktivität wird freigesetzt, sobald der Reaktionsansatz PCR-typische Temperaturen erreicht.
- Der automatisierte "Hot Start" erhöht PCR-Sensitivität und -Spezifität, Ausbeute und Detektionsempfindlichkeit im Vergleich zu herkömmlichen PCR-Ansätzen.
- tiHybrid DNA Polymerase ist eine gentechnisch optimierte, synthetische und präzise DNA Polymerase.
- Hergestellt aus hochreinen, rekombinanten Enzymen.
- Stabilisiert die Hybridisierung zwischen Primer und Template-DNA.
- Das Enzym katalysiert bei Anwesenheit von Magnesium-Ionen die Polymerisation von Nucleotiden zu Duplex-DNA in 5'→3' Richtung.
- Das Enzym besitzt 3'→5' Korrekturleseaktivität ("proofreading") und ermöglicht eine Steigerung der Genauigkeit um den Faktor 10 im Vergleich zu Taq DNA-Polymerasen.
- Das Enzym erzeugt ausschließlich stumpfe ("blunt") Enden.
- Kürzere PCR-Amplifikationszeiten durch erhöhte Polymerase-Prozessivität und durch die Möglichkeit, Annealing- und Extensionsschritte zusammenzufassen ("2-Schritt"- statt "3-Schritt"-Reaktionen).
- Die Modifikationen der Hybrid DNA Polymerase ermöglichen eine effiziente Amplifikation langer DNA Fragmente. Besonders mit genomischen DNA-Vorlagen werden im Vergleich zu PfuPlus! Polymerase deutlich längere Fragmente amplifiziert.
- **Aufgrund der genetischen Optimierungen unterscheiden sich die idealen PCR-Reaktionsbedingungen, speziell die Annealing-Temperaturen, von Standard-PCR-Protokollen.**
- tiHybrid DNA Polymerase wird für PCR-Reaktionen empfohlen, bei denen hohe Genauigkeit benötigt wird; für PCRs von GC-reichen Regionen; für Bereiche mit problematischen Sekundärstrukturen sowie zur Klonierung von PCR-Produkten mit stumpfen Enden (blunt ends).

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 % Glycerin und Stabilisatoren.

10 x Reaktionspuffer:

10 x Hybrid Buffer
Der Puffer enthält 15 mM MgCl₂.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf 3'-Exonuklease-, sowie unspezifische einzel- und doppelsträngige DNase Aktivitäten geprüft. Typische Präparationen sind zu mehr als 95 % rein, wie aufgrund von SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese beurteilt werden kann.



TI Hybrid DNA Polymerase PCR PROTOKOLL

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
10 x Hybrid Buffer, enthält 15 mM MgCl ₂	5 µl	1x
dNTP mix (je 5mM)	2.0 µl	0.2 mM je dNTP
Vorwärts Primer	Variabel	0.5 µM
Reverser Primer	Variabel	0.5 µM
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	<0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Variabel	-
DMSO (optional)	1-5 µl	2-10 % (v/v)
tiHybrid DNA Polymerase, 2 U/µl	0.5 µl	1 U
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.
- Pipettieren bei 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.
- Enzym als letzte Komponente zufügen.** tiHybrid DNA Polymerase sollte die letzte Komponente sein, die zum Reaktionsansatz zugefügt wird. In Abwesenheit von dNTPs kann die Korrekturlese- ("proofreading") Aktivität des Enzyms die Degradation von PCR-Primern verursachen.
- MgCl₂.** Für tiHybrid DNA Polymerase basierte PCR-Reaktionen beträgt die Standardkonzentration von MgCl₂ 1.5 mM (wie bei Verwendung des 1 x Hybrid Puffers bereitgestellt). In den meisten Fällen werden mit dieser Konzentration gute Ergebnisse erzielt. Wenn höhere Mg²⁺-Konzentrationen benötigt werden, sollte die beiliegende 25 mM MgCl₂ Stammlösung verwendet werden.
- Enzymmenge tiHybrid.** Die empfohlene Menge an tiHybrid DNA Polymerase pro Reaktion beträgt 1 U je 50 µl PCR-Reaktionsvolumen. Für die meisten Anwendungen ist das Enzym im Überschuss vorhanden und zufriedenstellende Resultate werden erzielt. Für einzelne PCR Reaktionen kann eine Anpassung der Enzymmenge notwendig sein. Eine zu hohe Menge eingesetzten Enzyms kann zu Artefakten, beispielsweise zu verschmierten Banden o.ä. führen.
- Nur hochwertige dNTPs verwenden.** Für eine optimale Funktionalität der tiHybrid DNA Polymerase sollten qualitativ hochwertige dNTPs verwendet werden.
- PCR-Additiva.** In den meisten Fällen ist ein Zusatz von Additiven ("PCR-Enhancer") nicht notwendig. Für einige, schwierig amplifizierbare DNA-Vorlagen (beispielsweise GC-reiche Sequenzabschnitte, Sequenzen mit komplexen Sekundärstrukturen, sehr lange DNA-Templates) können Additive wie DMSO verwendet werden, um die Amplifikationsrate zu erhöhen. Wenn benötigt, beträgt die empfohlene DMSO-Konzentration für einen ersten Versuch 3 %.
- Optimale Menge an DNA-Vorlage.** Die benötigte Menge an Vorlagen ("Template"-) DNA Molekülen hängt von der Art der zu amplifizierenden DNA-Vorlage ab. Generell wird empfohlen, etwa folgende Mengen einzusetzen: 50-250 ng genomische DNA, 0.1-10 ng Plasmid-DNA, 1-20 ng Phagen-DNA oder 10-100 ng von solchen chromosomalen Genen, die in mehreren Wiederholungen vorliegen.

Hinweise:

- Ein einleitender Denaturierungsschritt** für 30 Sekunden bei 98°C wird für die meisten DNA-Vorlagen bis 10 kb Länge empfohlen. Die initiale Denaturierung kann bei schwierigen Templates auf bis zu drei Minuten ausgedehnt werden. Denaturierungsschritte bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen ermöglichen eine höhere Ausbeute bei DNA-Vorlagen über 10 kb Länge.
- Primerbindungstemperatur.** tiHybrid DNA Polymerase stabilisiert die Primer-Template Hybridisierung. Infolgedessen sind die Schmelztemperaturen (T_m) und die optimalen Annealingtemperaturen meist signifikant höher als die entsprechenden Temperaturen für Standard DNA Polymerasen. Die Schmelztemperaturen sollten nach der sog. base-stacking (bzw. nearest neighbor) Methode berechnet werden. Ein entsprechender Online-Rechner steht auf der Roboklon-Webseite bereit (<http://www.roboklon.de/eurx/hybrid>). Die Standard-Parameter sind: Primerkonzentration 500 nM, Salzkonzentration 50 mM, 1.5 mM Mg²⁺ - Konzentration. Grundsätzlich gilt: Für Primer mit weniger als 20 nt Länge sollte eine Anlagerungs- (Annealing-) Temperatur von 3°C oberhalb der Schmelztemperatur des niedrigstschmelzenden Primers gewählt werden. Für Primer einer Länge von exakt 20 nt entspricht die Anlagerungstemperatur genau der Schmelztemperatur des niedrigstschmelzenden Primers. In einigen Fällen kann allerdings die optimale Anlagerungstemperatur von diesen Faustregeln abweichen. Hier muss die optimale Annealing-Temperatur empirisch bestimmt werden.
- Kombinierter Primerbindungs- und Elongationsschritt.** Ein zweistufiges Protokoll erlaubt es, den Annealing- und Extensionsschritt bei einer Temperatur von 72°C zu kombinieren und somit den Zeitaufwand für eine PCR-Reaktion zu verkürzen. Zweistufige Protokolle empfehlen sich, wenn die T_m der Primer wenigstens 69°C (>20 nt) oder 72°C (=20nt) betragen.
- Extensionszeit.** Die empfohlene Extensionszeit beträgt 30 Sekunden je 1 kb Länge. In einigen Fällen (episomale DNA-Vorlagen bis 2 kb Länge) kann die Extensionszeit auf 15-20 Sekunden je kb Länge verkürzt werden, ohne die PCR-Ausbeute zu beeinträchtigen.

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) für Produkte einer Länge bis zu 10 kb:

Schritt	2-Schritt Protokoll		3-Schritt Protokoll		Anzahl der Zyklen
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	98°C	30 s	1
Denaturierung	98°C	5-10 s	98°C	5-10 s	25-35
Annealing	-	-	X°C	10-30 s	
Extension	72°C	30 s / 1 kb	72°C	30 s / 1 kb	
a. genomische und episomale DNA-Vorlagen größer als 2 kb	72°C	30 s / 1 kb	72°C	30 s / 1 kb	
b. episomale DNA-Vorlagen bis 2 kb	72°C	15-20s / 1 kb	72°C	15-20s / 1kb	
Finale Extension	72°C	5-7 min	72°C	5-7 min	1
Kühlschritt	4°C	Indefinite	4°C	Indefinite	1

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) für Produkte einer Länge größer als 10 kb:

Schritt	2-Schritt Protokoll		3-Schritt Protokoll		Anzahl der Zyklen
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	92-93°C	2 min	92-93°C	2 min	1
Denaturierung	92-93°C	10 s	92-93°C	10 s	25-35
Annealing	-	-	X°C	10-30 s	
Extension	72°C	30 s / 1 kb	72°C	30 s / 1 kb	
Finale Extension	72°C	5-7 min	72°C	5-7 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	4°C	Unbegrenzt	1