

# TITAQ

## tiTaq Master Mix

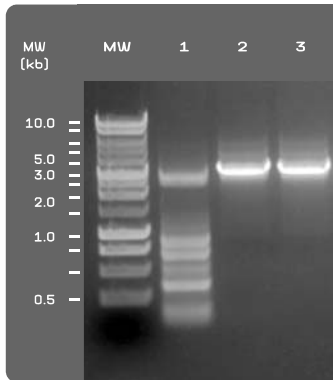
PCR System für automatisierten "Hot Start"

### tiTaq Master Mix (*Thermus aquaticus*)

Artikel Nr.	Größe
E2716-01	100 Reaktionen je 50 µl
E2716-02	100 Reaktionen je 50 µl
E2716-03	100 Reaktionen je 50 µl

#### Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°C für Langzeitaufbewahrung  
oder bei +4°C für bis zu zwei Monate.



#### PCR Amplifikation unter Verwendung von EURx tiTaq PCR Master Mix.

Amplifiziert wurde ein 2 kb-Fragment des humanen beta-Globin Genes. Lediglich zur Verdeutlichung des "HotStart"-Effektes wurden die Reaktionsansätze vor der PCR-Reaktion für 30 min bei 25°C inkubiert, um die Bildung unerwünschter, unspezifischer Nebenprodukte gezielt zu provozieren.

Spur M: Molekulargewichtsmarker - Perfect Plus 1 kb DNA Leiter (Best.Nr. E3131)

Spur 1: PCR-Amplifikation mit nicht-"HotStart" Taq PCR Master Mix. Unter den gewählten, ungünstigen Bedingungen werden unerwünschte PCR-Nebenprodukte gebildet.

Spur 2: PCR-Amplifikation mit "HotStart" tiTaq PCR Master Mix. Trotz unspezifischen Primings vor der initialen Denaturierung kommt es nicht zur Bildung unspezifischer PCR-Produkte.

#### 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 <sup>-6</sup>
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. Erschwingliche Alternative zu Antikörper-vermitteltem „HotStart“.**

#### Beschreibung:

- tiTaq PCR Master Mix (2x) ist eine gebrauchsfertig abgestimmte Mischung aus tiTaq DNA Polymerase, optimiertem Reaktionspuffer, MgCl<sub>2</sub> und dNTPs.
- Die Blockierung der Polymeraseaktivität erfolgt nicht per Antikörper. tiTaq ermöglicht das Zusammenfügen von PCR-Reaktionskomponenten bei Raumtemperatur.
- Bei Raumtemperatur blockierte DNA Polymerase-Aktivität wird unter regulären PCR-Bedingungen wieder hergestellt.
- Die zuverlässige, hohe Stabilität des Taq-Inhibitor-Komplexes bei niedrigen Temperaturen erhöht PCR-Spezifität, -Ausbeute und -Empfindlichkeit im Vergleich zu nicht-"Hot Start" PCR-Reaktionen.
- Der temperaturabhängige Inhibitor blockiert bei Raumtemperatur die Restaktivität der Taq DNA 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.
- Katalysiert die Polymerisation von Nukleotiden 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.

#### Packungsinhalt:

1. tiTaq PCR Master Mix (2x)
2. PCR-Wasser, nukleasefrei
3. 10 x Color Load Puffer
4. Thermolabile Uracil N-Glykosylase (UNG)

#### tiTaq PCR Master Mix (2x):

Der Mix enthält 2 x Pol Buffer B mit 3 mM MgCl<sub>2</sub> und 0.4 mM je dNTP.  
Finale Konzentrationen: 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 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. 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 Master Mix

## „HOT START“ PCR PROTOKOLL

### Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
tiTaq PCR Master Mix (2x)	25 µl	1,25 U tiTaq DNA Polymerase 1 x Reaktionspuffer (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ) 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
Wasser, nukleasefrei	auf 50 µl	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

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

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

$$\frac{\text{DNA Menge [ng]} \cdot 6,022 \times 10^{23} [\text{Moleküle mol}^{-1}]}{\text{Genomische DNA Länge [kb]} \cdot 616 [\text{g mol}^{-1} \text{bp}^{-1}]} \cdot \frac{10^{-3} [\text{kb bp}^{-1}]}{10^9 [\text{ng g}^{-1}]}$$

Optimal: 10<sup>4</sup> 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 10-fach Puffer), da solche Lösungen im gefrorenen Zustand Konzentrationsgradienten bilden.
- Primermix.** Primer separat oder als Primermix zufügen.
- Ansatz bei Raumtemperatur.** Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der *Taq* DNA Polymerase zunächst durch den thermal abhängigen Inhibitor reversibel blockiert 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.
- MgCl<sub>2</sub>.** Die Standard-Endkonzentration von MgCl<sub>2</sub> 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 MgCl<sub>2</sub>-Konzentration experimentell zu bestimmen.  
1 µl einer 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung fügt 25 nmol zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration einer 50 µl Reaktion um 0,5 mM. Erhöhung der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration erhöht die PCR-Ausbeute, aber vermindert die Reaktionsspezifität (mehr Banden, aber auch mehr unerwünschte Banden werden amplifiziert). Verminderung der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration führt zu niedriger PCR-Ausbeute, aber erhöht die Spezifität der Reaktion.
- 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.
- 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 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 ds DNA entspricht 9,8 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. 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<sub>m</sub>, die auf den Primer-Datenblättern angegeben werden. Die optimale Annealing Temperatur kann ober- oder unterhalb des abgeschätzten T<sub>m</sub> liegen. Als Startpunkt für weitere Optimierungen sollte die Annealing-Temperatur zunächst um 5°C unterhalb T<sub>m</sub> gewählt werden.
- Lange PCRs:** Wenn lange PCR-Produkte (über 5 kb Länge) amplifiziert werden sollen, dann soll:  
(a) eine einleitende Denaturierung für 2 min bei 94°C durchgeführt werden.  
(b) je Zyklus sollte die Denaturierung 15-20 s bei 94°C betragen  
(c) 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.