

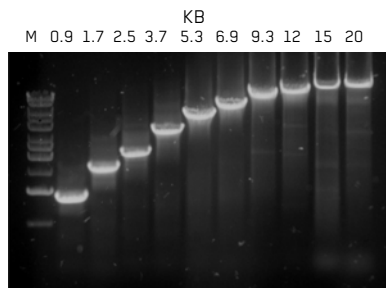
Opti*Taq* DNA Polymerase

Taq DNA Polymerase
(*Thermus aquaticus*)
Pfu DNA Polymerase
(*Pyrococcus furiosus*)

Artikel Nr.	Größe
E2600-01	200 Einheiten
E2600-04	500 Einheiten
E2600-02	1000 Einheiten
E2600-03	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 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 **Opti*Taq*** DNA-Polymerase. Spur M: Molekularer Größenmarker EURx Perfect™ 1-kb-Leiter (E3130-02). Spuren: 0.9 bis 9.3 kb: PCR-Amplifikation unter Verwendung von Puffer B mit 0.2 mM dNTPs und 1,25 U EURx Opti*Taq* DNA Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl; Spuren: 12 bis 20 kb: PCR-Amplifikation unter Verwendung von Puffer C mit 0.35 mM dNTPs und 1,25 U EURx Opti*Taq* DNA Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl

Opti*Taq* DNA Polymerase ist eine Mischung von thermostabilen DNA-Polymerasen und zusätzlichen, die PCR unterstützenden Faktoren. Mit diesem Enzym können Produkte einer Länge von mehr als 20 kb Länge und hoher Genauigkeit amplifiziert werden. Das Enzym ist geeignet für die Synthese von DNA bei hohen Temperaturen.

Beschreibung:

- Opti*Taq* DNA-Polymerase ist eine modifizierte und optimierte thermostabile Enzym-Mischung Sie besteht aus *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase, *Pyrococcus furiosus* DNA-Polymerase und zusätzlichen, die PCR unterstützenden Faktoren.
- Opti*Taq* DNA-Polymerase wird aus ultrareinen, rekombinanten Enzymen hergestellt.
- Die Enzym-Mischung besitzt 3'→5' Korrekturleseaktivität (proofreading) und erzielt damit eine Genauigkeit, die beträchtlich über derjenigen unmodifizierter Taq DNA-Polymerase liegt (1).
- Besitzt 5'→3' Exonukleaseaktivität.
- PCR-Produkte können sowohl einen -A Überhang (ca. 5% der Produkte) als auch stumpfe Enden (blunt ends) (ca. 95% der Produkte) besitzen. Somit sind im Anschluß sowohl TA- als auch Blunt- Klonierungsreaktionen möglich.
- Bestens geeignet für Multiplex-PCR, da Opti*Taq* im Vergleich zu unmodifizierter Taq Polymerase eine breitere Toleranz gegenüber Mg²⁺- und Salz-Konzentrationen sowie dem pH-Wert des Reaktionsansatzes aufweist (2,3).
- Verbessert PCR-Ergebnisse von kritischen Vorlagen (templates), wie Regionen mit erhöhtem GC-Gehalt, Palindromen oder hoch repetitiven Sequenzbereichen.
- Erhöhte Ausbeute und erhöhte Produktgüte. Die Anzahl der PCR-Zyklen kann verringert werden, da der Anteil unvollständig verlängerter PCR-Produkte deutlich reduziert ist.
- Ideal für die genomische Sequenzierung und Lokalisierung von Genabschnitten (mapping), da der Zusammenbau von Contigs aus PCR-Produkten größerer Länge deutlich vereinfacht wird.
- Opti*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 mehr als 20 kb erhalten werden.

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

20 mM Tris-HCl (pH 8.0 bei 22°C), 100 mM KCl, 0.5 % Tween20, 0.5 % Igepal CA-630, 0.1 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin.

10 x Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

10 x Pol Buffer A (Optimierungspuffer ohne MgCl₂):

Dieser Puffer enthält kein MgCl₂ und erlaubt die Optimierung der MgCl₂ - Konzentration.

10 x Pol Buffer B (generelle Anwendung, bis zu 8-10 kb):

Der Puffer enthält 15 mM MgCl₂ 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-Schwerlösung 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.

Literatur:

1. Cline, J., Braham, J. und Hogrefe, H. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24, 3546.
2. Chien, A., Edgar, D.B. und Trela, J.M. (1976) *J. Bacteriol.* 127, 1550.
3. Kaledin, A.S., Sliusarenko, A.G. und Gorodetski, S.I. (1980) *Biokhimiya* 45, 644.

Opti Taq DNA Polymerase 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 PolPuffer 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 10 x Pol Buffer B oder 10 x Pol Buffer C	1 - 5mM 1.5 - 7 mM
dNTP Mix (je 5mM)	2 µl	0.2 mM je dNTP
Vorwärts-Primer	Variabel	0.3-0.5 µM
Reverser Primer	Variabel	0.3-0.5 µM
Opti Taq DNA Polymerase, 5 U/µl	0.25µl	1.25 U
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	<0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Variabel	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) für Produkte einer Länge von 0.1 – 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 Produkte einer Länge >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 zusätzlichem Zyklus	
Finale Extension	68°C	7 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	1

Hinweise:

- 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 Puffer), da solche Lösungen im gefrorenen Zustand Konzentrationsgradienten bilden.
- Die Reaktionsansätze sollten auf Eis pipettiert werden, da DNA Polymerasen auch bei moderaten Temperaturen Aktivität besitzen. Gut mischen.
- Um die Bildung von Primer-Dimeren zu minimieren, wird empfohlen, die PCR Reaktionen in einen PCR Cycler zu stellen, dessen Block auf die Denaturierungstemperatur vorgeheizt wurde.
- Bei Verwendung einer dNTP Konzentration von 0.2 mM je dNTP beträgt die Standard-Endkonzentration von MgCl₂ in PCR Reaktionen 1.5 mM (wie in Pol Puffer B und C bereitgestellt). In den meisten PCR Reaktionen werden mit diesen Konzentrationen zufriedenstellende Resultate erzielt. In einigen Fällen ist es jedoch notwendig, die optimale MgCl₂-Konzentration experimentell zu bestimmen. Für diesen Zweck ist Puffer A vorgesehen.
- 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-Schwerlösung 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.
- Die empfohlene Menge an Opti 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 zufriedenstellende Resultate werden erzielt. Eine zu hohe Menge an eingesetztem Enzym kann zu Artefakten, beispielsweise zu verschmierten Banden führen.
- 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 10⁸ Molekülen, 1 µg von menschlicher genomischer DNA entspricht 3 x 10⁸ Molekülen.
- Für die Amplifikation langer PCR-Fragmente sollten folgende Mengen an Template-DNA eingesetzt werden: 50-100 ng humaner genomischer DNA, 0.1-10 ng von bakterieller, Plasmid- und Phagen-DNA.
- Es sollte sichergestellt sein, dass die Template DNA von möglichst hoher Qualität ist. Nur Template-DNA mit hohem Molekulargewicht sollte als Kopiervorlage verwendet werden, wenn lange PCR-Amplikons vervielfältigt werden sollen (länger als 20-50 kb, abhängig von der Amplikon-Länge).
- Hochmolekulare, komplexe genomische DNA sollte bevorzugt bei 2°C bis 8°C gelagert werden, um Scherung durch Eiskristallbildung zu vermeiden. Zur Vermeidung von DNA-Scherung sollte auch das Vortexen genomischer DNA vermieden werden.
- Benutzen Sie für die Amplifikation langer PCR Fragmente ausschließlich dünnwandige Plastik-Reaktionsgefäße mit einem Füllvermögen von 0.2 µl.

Hinweise:

- 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.
- Um die Reaktionsspezifität zu erhöhen, besitzen Primer für die Amplifikation langer PCR-Fragmente typischerweise eine Länge von 22-34 bp und eine Annealing-Temperatur von mehr als 60°C.
- Sollen lange PCR-Fragmente erzeugt werden, sind die Denaturierungsschritte so kurz wie möglich zu halten. Versuchen Sie, einen einleitenden Denaturierungsschritt nicht länger als 2 min bei 94°C und eine Denaturierungszeit nicht länger als 10-15 s pro Zyklus zu wählen. In einigen Fällen benötigen Vorlagen ("Templates") mit hohem GC-Gehalt höhere Temperaturen, um vollständig zu denaturieren. Berücksichtigen Sie aber bitte, dass die Ausbeute steigt, wenn zeitliche Dauer und Temperatur des Denaturierungsschrittes möglichst gering gewählt werden.
- 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-ärmer) Sequenzabschnitte empfohlen, beispielsweise für einige Bereiche des *Arabidopsis*-Genoms.
- Sollen PCR-Produkte einer Länge von mehr als 10 kb erzeugt werden, wird sehr empfohlen, mit Beginn des 11. Zyklus die Zeitdauer des Elongationsschrittes je Zyklus um 20 s zu erhöhen. Hierdurch wird kompensiert, dass der Enzymmix mit fortschreitender Amplifikationsdauer zunehmend an Aktivität verliert.