

Taq DNA Polymerase

Rekombinant

Taq DNA Polymerase (*Thermus aquaticus*)

Artikel Nr.	Größe
E2500-01	200 Einheiten
E2500-04	500 Einheiten
E2500-02	1000 Einheiten
E2500-03	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 **Taq** DNA Polymerase. Spur M: Molekularer Größenmarker EURx Perfect™ 1-kb-Leiter (E3130-02). Spuren: 1.1 bis 9.3 kb: PCR-Amplifikation unter Verwendung von Puffer B mit 0.2 mM dNTPs und 1,25 U EURx **Taq** DNA Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

Thermostabile DNA-Polymerase für die Synthese von DNA bei hohen Temperaturen.

Beschreibung:

- *Taq* DNA-Polymerase ist ein thermostabiles Enzym aus *Thermus aquaticus* mit einer Größe von etwa 94 kDa.
- Hochreines, rekombinantes Protein.
- Das Enzym repliziert DNA in einem breiten Temperaturbereich mit einem Aktivitätsoptimum bei 72°C - 74°C. Bei 95°C besitzt das Enzym eine Halbwertszeit von 40 Minuten (1, 2).
- 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 ("proofreading"). Wird an ein DNA-Molekül während der Amplifikation ein fehlerhaft paarendes Nucleotid eingebaut, kann es von *Taq* DNA Polymerase nicht weiter verlängert werden.
- Geeignet für PCR-Reaktionen, bei denen nicht paarende, gegenüberliegende Nucleotide ("mismatches") erhalten bleiben sollen.
- Fügt ein überhängendes A am 3'-Ende an (betrifft etwa 5 % der Amplikons). Etwa 95 % der Amplikons besitzen ein stumpfes ("blunt") Ende.
- *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 10 kb erhalten werden.

Lagerungspuffer (Storage Buffer)

20 mM Tris-HCl (pH 8.0 bei 22°C), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 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 10 kb):

Der Puffer enthält 15 mM MgCl₂ und ist für den Gebrauch mit 0.1 - 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.

Literatur:

1. Chien, A., Edgar, D.B. und Trela, J.M. (1976) *J. Bacteriol.* 127, 1550.
2. Kaledin, A.S., Sliusarenko, A.G. und Gorodetskij, S.I. (1980) *Biokhimiya* 45, 644.



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 Pol Puffer C	5 µl	1x
25 mM MgCl ₂	2 - 10 µl bei Verwendung von 10x Pol Buffer A oder 0- 7 µl bei Verwendung von 10x Pol Buffer B oder C	1-5mM 1.5 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
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	-

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: 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	15-60 s	25-35
Annealing	50-68°C	30-60 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:** Die PCR-Reaktion ist eine Art homöopathischer Prozess, der am besten funktioniert, sobald *alle* Komponenten nur in homöopathischen Dosen eingesetzt werden.
- 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.
- Auf Eis:** Die Reaktionsansätze sollten auf Eis pipettiert werden, da Taq DNA Polymerase auch bei moderaten Temperaturen Aktivität besitzt. Gut mischen.
- Zyklus vorheizen:** Um die Bildung von Primer-Dimeren zu minimieren, wird empfohlen, die PCR Reaktionen in einen PCR Cycler zu stellen, dessen Block auf 94-95°C vorgeheizt wurde.
- MgCl₂:** Die Standard-Endkonzentration von MgCl₂ in PCR-Reaktionen beträgt 1.5 mM (wie in Pol Puffer B und C bereitgestellt) - für die meisten PCR Reaktionen optimal. In einigen Fällen ist es jedoch notwendig, die optimale MgCl₂-Konzentration experimentell zu bestimmen. Für diesen Zweck ist Puffer A vorgesehen.
1 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung fügt 25 nmol zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die MgCl₂-Konzentration einer 50 µl Reaktion um 0.5 mM.
Erhöhung der MgCl₂-Konzentration erhöht die PCR-Ausbeute, aber vermindert die Reaktionsspezifität (mehr Banden, aber auch mehr unerwünschte Banden werden amplifiziert). Verminderung der MgCl₂-Konzentration führt zu niedriger PCR-Ausbeute, aber erhöht die Spezifität der Reaktion.
- 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-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. Dennoch wird empfohlen, PCR-Produkte vor der weiteren Verwendung aufzureinigen.
- Enzymmenge Taq:** Die empfohlene Menge an 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.
- 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 10⁹ Molekülen. Zu hohe Mengen eingesetzter Vorlagen-DNA (>0,5 µg) können die PCR-Ausbeute beeinträchtigen bzw. die PCR-Reaktion inhibieren.

Hinweise:

- Primerbindung:** Die Primerbindungs (Annealing-) Temperatur sollte auf jedes Primerpaar optimal angepasst werden. Ausgangspunkt sind auf den Primer-Datenblättern angegebene Schmelztemperaturen T_m. Die optimale Annealing Temperatur kann ober- oder unterhalb des abgeschätzten T_m liegen. Als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen sollte die Annealing-Temperatur zunächst um 5°C unterhalb T_m wählen.
- 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.