

# Taq PCR Master Mix (2x)

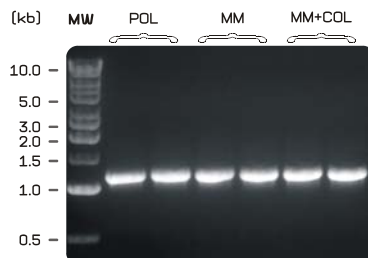
## 2x Taq PCR Master Mix *Taq DNA Polymerase*

Artikel Nr.	Größe
E2520-01	100 Reaktionen je 50 µl
E2520-02	200 Reaktionen je 50 µl
E2520-03	500 Reaktionen je 50 µl

**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 (langfristig, über 12 Monate haltbar) oder bei +4°C bis zwei Monate.



### PCR Amplifikation unter Verwendung von EURx Taq PCR Master Mix (2x).

Ein Amplikon einer Länge von 1.1 kb (humanes CCR5 Gen) wurde mit nicht vorgemischter Taq DNA Polymerase und mit Taq Master Mix vervielfältigt.

Spur MW: Molekulargewichtsmarker-Perfect 1 kb DNA Ladder (Best. Nr. E3130).

Spur POL (1,2): PCR-Amplifikationsreaktion mit 1.25 U Taq DNA Polymerase, Pol Buffer B und dNTPs

Spur MM (3,4): PCR-Amplifikationsreaktion mit Taq PCR Master Mix (2x), nach 25 Gefrier-/Auftau-Zyklen.

Spur MM+COL (5,6): PCR-Amplifikationsreaktion mit Taq PCR Master Mix (2x) und 10 x Color Load, nach 25 Gefrier-/Auftau-Zyklen.

**Taq DNA Polymerase Master Mix, mit stabiler und reproduzierbarer Amplifikationsleistung auch nach mehr als 25 Gefrier-/Auftau-Zyklen und 12-monatiger Lagerung.**

### Beschreibung:

- Taq PCR Master Mix (2x) ist eine gebrauchsfertig abgestimmte Mischung aus Taq DNA Polymerase, optimiertem Reaktionspuffer, MgCl<sub>2</sub> und dNTPs.
- Spart Zeit, erhöht die Reproduzierbarkeit (durch Minimierung von Kalkulations- und Pipettierfehlern) und reduziert das Risiko von Kontaminationen (wegen Verminderung der Pipettierschritte) während der PCR-Vorbereitung.
- Der Taq PCR Master Mix bleibt auch nach mehreren Gefrier-/Auftau-Zyklen reproduzierbar aktiv. Selbst nach 25 Gefrier-/Auftau-Zyklen wird keine Abnahme der Amplifikationsleistung gemessen.
- Die Amplifikationsleistung ist identisch zu reiner Taq DNA Polymerase (Best. Nr. E2500). Zusätzlich werden Aliquots reinen, nukleasefreien Wassers mitgeliefert. PCRs werden ohne das Risiko des DNA-Eintrages durch kontaminiertes Wasser angesetzt.
- Optional können PCRs mit dem mitgelieferten 10x Color Load Puffer angesetzt werden. Aliquots von Color Load PCRs können direkt, ohne Auftragspuffer, auf Agarosegele pipettiert werden.
- Taq DNA-Polymerase ist ein thermostabiles Enzym aus *Thermus aquaticus* mit einer Größe von etwa 94 kDa. Ultrareines, rekombinantes Protein.
- Das Enzym repliziert DNA bei 74°C und besitzt eine Halbwertszeit von 40 Minuten bei 95°C (1,2).
- 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).
- 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.

### Taq PCR Master Mix (2x), Packungsinhalt:

1. Taq PCR Master Mix (2x)
2. PCR-Wasser, nukleasefrei
3. 10 x Color Load Puffer

### Taq 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 Gorodetskiĭ, S.I. (1980) *Biokhimiya* 45, 644.

# Taq PCR Master Mix (2x)

## PCR PROTOKOLL

### Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
Taq PCR Master Mix (2x)	25 µl	1.25 U Perpetual Taq 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
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Auf 50 µl	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

### 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:

- Konzentrationsunterschiede vermeiden:** Taq PCR Master Mix (2x) vollständig auftauen, vorsichtig vortexen und kurz anzenrifugieren, um lokale Unterschiede in der Salzkonzentration zu vermeiden.
- Auf Eis:** Die Reaktionsansätze sollten auf Eis pipettiert werden, da Taq DNA Polymerase auch bei moderaten Temperaturen Aktivität besitzt.
- Primermix:** Primer können entweder separat oder als Primermix zugefügt werden.
- Mischen:** DNA-Proben kurz vortexen und anzenrifugieren.
- Zyklus vorheizen:** Um die Bildung von Primer-Dimeren zu minimieren, wird empfohlen, die PCR Reaktionen in einen auf 94-95°C vorgeheizten PCR Cycler zu stellen.
- MgCl<sub>2</sub>:** Die Standard-Endkonzentration von MgCl<sub>2</sub> in PCR-Reaktionen beträgt 1.5 mM (wie in 1 x Taq PCR Mastermix bereitgestellt) - für die meisten PCR Reaktionen optimal. Wenn höhere MgCl<sub>2</sub> Konzentrationen benötigt werden, sollte eine 25 mM MgCl<sub>2</sub> Stammlösung hergestellt werden (kann bei Bestellung bei uns angefordert werden). 1 µl einer 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung fügt 25 nmol zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration einer 50 µl Reaktion um 0.5 mM.
- Farbiger Ladepuffer:** Der 10x Color Load Puffer ermöglicht es, 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 und der gelbe Farbstoff migriert schneller als 20 bp. Obwohl die Farbstoffe anschließende enzymatische Reaktionen meist nicht beeinflussen, schadet es nicht, die PCR-Produkte vor nachfolgenden Reaktionen aufzureinigen.
- 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 9.1 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.  
Generische Formel zur Berechnung der Anzahl an Genen / Genomen aus der DNA-Masse:  
Anzahl Kopien [Moleküle] = (DNA Masse [ng] x 6.022 x 10<sup>23</sup> [Moleküle mol<sup>-1</sup>] / (Länge [bp] x 1x10<sup>9</sup> [ng g<sup>-1</sup>] x 616 [g bp<sup>-1</sup>])  
(MW pro bp: siehe Dolezel et al. Cytometry, 2003, Vol. 51A, 2, 127-8)

### Hinweise:

- Primerbindung:** Die Primerbindungen (Annealing-) Temperatur sollte auf jedes Primerpaar optimal angepasst werden. Ausgangspunkt sind auf den Primer-Datenblättern angegebene Schmelztemperaturen T<sub>m</sub>. Die optimale Annealing Temperatur kann ober- oder unterhalb des abgeschätzten T<sub>m</sub> liegen. Als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen sollte die Annealing-Temperatur zunächst um 5°C unterhalb T<sub>m</sub> wählen.
- Lange PCRs:** Wenn lange PCR-Produkte (über 5 kb Länge) amplifiziert werden sollen, dann soll:
  - eine einleitende Denaturierung für 2 min bei 94°C durchgeführt werden.
  - je Zyklus sollte die Denaturierung 15-20 s bei 94°C betragen
  - eine Elongationstemperatur von 68°C anstelle von 72°C gewählt werden. Diese Elongationstemperatur wird auch für die Amplifikation extrem AT-reicher (also GC-ärmer) Sequenzabschnitte empfohlen, beispielsweise für einige Bereiche des Arabidopsis-Genoms.