

Tth DNA Polymerase

(*Thermus thermophilus*)

Tth DNA Polymerase (*Thermus thermophilus*)

Artikel Nr.	Größe
E1115-01	200 Einheiten
E1115-02	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

Enzymeigenschaften:

Eigenschaft	Wert
Vorlage (Template)	ssDNA, dsDNA, RNA
5'-3' Exonuklease	ja
3'-5' Exonuklease	nein
Korrekturlese-aktivität ("Proofreading")	nein
5'-DNA-Strang-ersetzung	nein
Fehlerrate	>10 ⁻⁶
Relative Fehler-rate* (Taq = 1)	1
Halbwertszeit bei 95°C	40
Amplikonlänge	bis 10 kb
Polymerisations-geschwindigkeit [kb/min]	2 - 4
Anhängen von A an 3'-Termini	ja (ein Teil aller Amplikons)
TA- / "Blunt" Klonierung	ja / ja

*Relative Fehlerrate := Fehlerrate *Tth* / *Taq*. Ein Wert von 10 bedeutet 10-fach höhere Genauigkeit im Verhältnis zu *Taq*, ein Wert von 1 zeigt identische Genauigkeit an.

Thermostabile DNA-Polymerase, besitzt Reverse Transkriptase-Aktivität.

Beschreibung:

- Geeignet für die für die Synthese von DNA bei hohen Temperaturen.
- Besitzt Reverse Transcriptase Aktivität, kann aus einer RNA-Vorlage (template) bei hohen Temperaturen einen komplementären cDNA-Strang synthetisieren (1).
- Dadurch wird eine hohe Spezifität in der Primer-Hybridisierung und -Extension erreicht und Probleme, die durch starke Sekundärstrukturen der RNA entstehen, werden minimiert.
- Minimiert auch Probleme mit DNA-Sekundärstrukturen in PCR-Reaktionen.
- Erhöhte Toleranz gegenüber einer Vielzahl von PCR-Inhibitoren bei Amplifikation aus problematischen Proben (2, 3, 4, 5, 6).
- In manchen Reaktionen kann die Toleranz gegenüber PCR-inhibierenden Substanzen durch Zugabe von T4 Gen 32 Protein (Art. Nr. E1170-01) weiter erhöht werden (6).

Lagerungspuffer (Storage 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.

Packungsinhalt:

Tth DNA Polymerase
10x Puffer
10x Puffer A (ohne MgCl₂)
10x Puffer B (1.5 mM MgCl₂ final)
10x Puffer C (wie Puffer B, mit Farbstoffen für direkte Gelbelastung)
MgCl₂ Lösung (25 mM)

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):

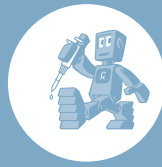
Dieser Puffer entspricht in der Zusammensetzung dem Puffer B, er ist aber zusätzlich mit zwei Farbstoffen und einer Gel-Schwerelösung angereichert. Mit diesem Puffer können Aliquots der PCR-Reaktion direkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen werden, ohne Zugabe eines separaten Gel-Ladepuffers.

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. Myers, T. W., Gelfand, D. H. (1991) *Biochemistry* 30, 7661-6.
2. Katcher, H. L., Schwartz, I. (1994) *Biotechniques* 16, 84-92
3. Poddar, S. K., Sawyer, M. H., Connor, J. D. (1998) *J. Med. Microbiol.* 47, 1131-5.1.
4. Wiedbrauk D L et al. (1995), *J Clin Microbiol.* 33 (10): 2643-2646
5. Abu Al-Soud, W., Rådström P. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* (64) 10, 3748-3753
6. Panaccio M, Lew A. (1991), *Nucleic Acids Res.* 19 (5), 1151



Tth 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
Tth DNA Polymerase, 5 U/µl	0.25µl	1.25 U (oder 1 - 5 U)
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	<0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Variabel	-
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.** Um lokale Unterschiede in der Salzkonzentration zu vermeiden, sollten alle Bestandteile der PCR-Reaktion, einschließlich Primer und Vorlagen-DNA vollständig aufgetaut und vor Benutzung gründlich gemischt werden, z.B. durch Vortexen. Das ist besonders wichtig für alle magnesiumhaltigen Lösungen (wie 10x-fach Puffer), da solche Lösungen im gefrorenen Zustand Konzentrationsgradienten bilden.
- Auf Eis.** Die Reaktionsansätze sollten auf Eis pipettiert werden, da Tth DNA Polymerase auch bei moderaten Temperaturen Aktivität besitzt.
- Primermix.** Primer können entweder separat oder als Primermix zugefügt werden.
- Zyklus vorheizen.** Um die Bildung von Primer-Dimeren zu minimieren, wird empfohlen, die PCR Reaktionen in einen PCR-Zyklus zu stellen, dessen Block auf 94-95°C vorgeheizt wurde.
- MgCl₂.** 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 dieser Konzentration zufriedenstellende Resultate erzielt. In einigen Fällen ist es jedoch notwendig, die optimale MgCl₂-Konzentration experimentell zu bestimmen. Für diesen Zweck ist Puffer A vorgesehen. Wenn höhere MgCl₂ Konzentrationen benötigt werden, sollte eine 25 mM MgCl₂ Stammlösung hergestellt werden (kann bei Bestellung bei uns angefordert werden). 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.
- Farbiger Ladepuffer.** Bei Verwendung des gefärbten 10x Puffers Pol 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-Schwerelösung 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.
- Enzymmenge.** Die empfohlene Menge an Tth 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. Für manche Applikationen kann die Enzymmenge in einem Bereich zwischen 1 und 5 U per 50 µl Reaktion variiert werden. 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 9.1 x 10¹¹ Molekülen, 1 µg von *E. coli* genomischer DNA entspricht 2 x 10⁹ Molekülen, 1 µg von menschlicher genomischer DNA entspricht 3 x 10⁸ Molekülen. Generische Formel zur Berechnung der Anzahl an Genen / Genomen aus der DNA-Masse:
Anzahl Kopien [Moleküle] = (DNA Masse [ng] x 6.022 x 10²³ [Moleküle mol⁻¹]) / (Länge [bp] x 1x10⁹ [ng g⁻¹] x 616 [g bp⁻¹])
(MW pro bp: siehe Dolezel et al. Cytometry, 2003, Vol. 51A, 2, 127-8)

Hinweise:

- Primerbindung.** 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.
- 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.