MANUFACTURED BY EURx

roboklon

NXT *Taq* – *FAST* PCR KIT HOT START

Hochgeschwindigkeits – Next Gen Taq Master Mix

Taq DNA Polymerase
(*Thermus aquaticus*) – modifiziert –

Artikel Nr.	**Größe**
E2530-01	100 Reaktionen je 20 µl
E2530-02	200 Reaktionen je 20 µl
E2530-03	500 Reaktionen je 20 µl

Lagerbedingungen:
Lagerung bei -20˚C (langfristig, mehr als 12 Monate haltbar) oder bei +4˚C bis zu zwei Monate.

NXT *Taq* DNA Polymerase - Eigenschaften:

Eigenschaft	**Wert**	**Bemerkungen**
Nukleinsäuren - Substrate	dsDNA ssDNA cDNA	
5'-3' Exonuklease	+	
3'-5' Exonuklease	-	keine
Korrekturlesung	-	nein
Einzelstrang-ersetzung	-	schwach
Primase	-	
Rel. Genauigkeit (Std. *Taq* = 1)	1	
Amplikonlänge	Bis 10 kb	
Extensions-geschwindigkeit	~35 bp/s 2 kb/min	
Anfügen von 3'-A Überhängen	ja	
Konieren von TA- / blunt	ja / ja	
Temperatur-bereich (Elon-gationsschritt)	62˚C - 72˚C	Optimum: 68˚C; low G+C: <68˚
Halbwertszeit bei 95˚C	40 min	
Empfohlene PCR-Anwendungen	Schnelle PCR HotStart PCR Multiplex PCR DNA-Fingerabdrücke Genotypisierung Generische PCR	

*Relative Fehlerrate := Fehlerrate NXT *Taq* / Std. *Taq* (rekombinant). Ein Wert von 10 bedeutet 10-fach höhere Genauigkeit im Verhältnis zu Standard-*Taq*, ein Wert von 1 zeigt identische Genauigkeit an.

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

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

Ermöglicht komplette PCR-Amplifikationen mit drastisch reduzierten Amplifikationszeiten.

Beschreibung:

- Das NXT *Taq* PCR Kit wurde im Hinblick speziell auf kurze Amplifikationszeiten optimiert. Es ermöglicht robuste Hochgeschwindigkeitsamplifikationen sowie zuverlässige, reproduzierbare und hohe Ausbeuten auf handelsüblichen PCR-Zyklern. Damit ist das NXT *Taq* PCR Kit hervorragend für zeitkritische Anwendungen wie die industrielle Qualitätskontrolle geeignet.
- Der Zeitaufwand für PCR-Reaktionen reduziert sich bei Einsatz des NXT *Taq* PCR Kits dramatisch (abhängig von der Amplikonlänge auf weniger als 45-60 Minuten), während PCR-Ausbeute und Reaktionsfreudigkeit unverändert erhalten bleiben.
- Annealing- und Denaturierungszeiten können drastisch auf lediglich jeweils 5 Sekunden reduziert werden. Für die DNA-Kettenverlängerung werden nur 3 Sekunden je 100 bp Amplikonlänge benötigt, auch mit schwierig zu vervielfältigenden DNA-Kopiervorlagen.
- PCR-Reaktionen mit der geschwindigkeitsoptimierten NXT *Taq* benötigen keine neuen, speziell angepassten Primer oder anderweitig geänderte Reaktionsbedingungen. Bestehende PCR-Programme werden einfach auf erheblich kürzere Denaturierungs-, Primerbindungs- und Extensionszeiten umgestellt.
- NXT *Taq* PCR Kit wird als gebrauchsfertiger, zweifach konzentrierter Master Mix ausgeliefert. Bestandteile sind "HotStart" NXT *Taq* DNA Polymerase, Reaktionspuffer, $MgCl_2$ und dNTPs.
- Ein monoklonaler, spezifischer Anti-*Taq* Antikörper inhibiert die Polymerase-Aktivität bei moderaten Temperaturen. Die Ausbildung von Komplexen zwischen *Taq* DNA Polymerase und Antikörper inhibiert die Residualaktivität von *Taq* Polymerase bei Raumtemperatur und ermöglicht das artefaktfreie Zusammenfügen aller Reaktionskomponenten. Die Polymeraseaktivität wird wieder hergestellt, sobald Antikörper während des einleitenden 95˚C-Schrittes irreversibel denaturieren.
- "HotStart" PCR kann gegenüber konventionellen PCR Reaktionen zu höherer Spezifität, höherer Sensitivität und zu höheren Ausbeuten führen, beispielsweise durch weitgehende Inhibition der Ausbildung von Primerdimeren.
- Das NXT *Taq* PCR Kit wird mit optimal einsetzbarer 10x Color Load Lösung ausgeliefert. Durch deren Beimengung zum Reaktionsansatz können PCR-Reaktionen direkt auf Agarose-Gele geladen werden.
- Das NXT *Taq* PCR Kits amplifiziert PCR-Produkte von bis zu 10 kb Größe.

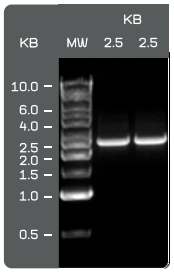


Abb. 1: Hochgeschwindigkeits-Amplifikation mit dem NXT *Taq* PCR Kit. Ein Genfragment des humanen CCR5 Gens von 2.5 kb Länge wurde mit den folgenden PCR-Bedingungen amplifiziert:
95˚C 5 min – 31x (96˚C 5s - 60˚C 5s - 68˚C 1 min 15 s) - 72˚C 1 min
Spur M: Molekulargewichtsmarker, Perfect 1 kb DNA Ladder (Best. Nr. E3130).
Lanes 1,2: PCR Amplifikationsreaktionen mit dem NXT *Taq* PCR Kit

NXT *Taq* PCR Master Mix (2x):

Der Mix enthält NXT *Taq* DNA Polymerase (HotStart), optimierten Reaktionspuffer, $MgCl_2$ und dNTPs.

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. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt, dass typische Präparationen zu mehr als 95 % rein sind.

ROBOKLON GMBH | ROBERT-RÖSSLE-STR.10 B55 | D-13125 BERLIN | GERMANY
FAX 030 / 310 19 19 7 | FON 030 / 318 09 37 2 | WWW.ROBOKLON.DE
HERGESTELLT VON EURx Sp. z o.o. POLAND | WWW.EURX.COM.PL | MADE IN THE EU

MANUFACTURED BY EURx

roboklon

NXT *Taq* - *FAST* PCR KIT HOT START

PCR PROTOKOLL

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
NXT *Taq* PCR Master Mix (2x)	10 µl	1 x
Vorwärts-Primer	Variabel	0.1-0.5 µM
Reverser Primer	Variabel	0.1-0.5 µM
Optional: 10x Color Load	2 µl	1 x
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	<0.2 µg/20 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Auf 20 µl	-
Gesamtvolumen	20 µl	-

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

$$Kopienanzahl\ Vorlagen - DNA\ [Moleküle] = \frac{DNA\ Menge\ [ng] \cdot 6.022\ x10^{23}\ [Moleküle\ mol^{-1}]}{Genomische\ DNA\ Länge\ [kb] \cdot 616\ [g\ mol^{-1}\ bp^{-1}]} \cdot \frac{10^{-3}\ [kb\ bp^{-1}]}{10^{9}\ [ng\ g^{-1}]}$$

Optimal: 10^4 Kopien der DNA-Vorlage
Maximal: 0,5 µg DNA oder weniger

Hinweise:

1. **Konzentrationsunterschiede vermeiden:** NXT *Taq* PCR Master Mix (2x) vollständig auftauen, vorsichtig vortexen und kurz anzentrifugieren, um lokale Unterschiede in der Salzkonzentration zu vermeiden.
2. **Raumtemperatur:** Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der NXT *Taq* DNA Polymerase zunächst durch den monoklonalen Antikörper reversibel inhibiert wird.
3. **Primermix:** Primer separat oder als Primermix zufügen.
4. **Proben mischen:** Kurz vortexen und anzentrifugieren.
5. **Zykler nicht vorheizen:** Ein Vorheizen des Thermocycler-Blocks auf 94-95°C vor Hineinstellen der PCR-Reaktionsansätze ist – im Unterschied zu Nicht-"HotStart" DNA Polymerasen - nicht notwendig.
6. **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.
7. **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.
8. **Kopienzahl DNA-Vorlage:** Die optimale Menge an Vorlagen ("Template"-) DNA Molekülen beträgt etwa 10^4 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^{11} Molekülen, 1 µg von *E. coli* genomischer DNA entspricht 2 x 10^8 Molekülen, 1 µg von menschlicher genomischer DNA entspricht 3 x 10^5 Molekülen. Zu hohe Mengen eingesetzter Vorlagen-DNA (> 0,5 µg) können die PCR-Ausbeute beeinträchtigen bzw. die PCR-Reaktion inhibieren.

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm):

Schritt	Tempera-tur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende Denaturierung	95°C	2-5 min	1
Denaturierung	96°C	5 s	25-35
Annealing	50-68°C	5 s	
Extension	72°C	3 s / 100 bp	
Finale Extension	72°C	1 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	1

Hinweise:

1. **Initiale Denaturierung:** Eine einleitende Denaturierung von 2 min Dauer ist zwingend notwendig, um den Antikörper zu denaturieren und die Aktivität der DNA Polymerase wieder herzustellen.
2. **Denaturierung "schwieriger" Vorlagen:** Zur Denaturierung schwieriger Vorlagen wird eine einleitende Denaturierung von 5 min Länge sehr empfohlen.
3. **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 die Annealing-Temperatur zunächst um 5°C unterhalb T_m.wählen.