

Perpetual Opti Taq PCR Master Mix (2x)

2x Perpetual Opti Taq
PCR Master Mix
Taq DNA Polymerase
Pyrococcus sp. DNA Polymerase

Artikel Nr.	Größe
E2770-01	100 Reaktionen je 50 µl
E2770-02	200 Reaktionen je 50 µl
E2770-03	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 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 (langfristig, über 12 Monate haltbar) oder bei +4°C bis zwei Monate.



Abb. 1: PCR Amplifikation unter Verwendung von EURx Perpetual Opti Taq PCR Master Mix (2x).

Ein Amplikon einer Länge von 2.5 kb wurde sowohl mit Perpetual Opti Taq DNA Polymerase plus separat gelagerter Komponenten als auch mit Perpetual Opti 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 Perpetual Opti Taq DNA Polymerase, Pol Buffer B und dNTPs

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

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

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

Beschreibung:

- Perpetual Opti Taq PCR Master Mix (2x) ist eine gebrauchsfertig abgestimmte Mischung aus Perpetual Opti Taq DNA Polymerase, optimiertem Reaktionspuffer, MgCl₂ und dNTPs.
- Spart Zeit, erhöht die Reproduzierbarkeit (durch Minimierung von Kalkulations- und Pipettierfehlern) und reduziert das Risiko von Kontaminationen (wegen verminderter Zahl erforderlicher Pipettierschritte) während der PCR-Vorbereitung.
- Der Perpetual Opti 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.
- Perpetual Opti Taq DNA-Polymerase ist eine modifizierte und optimierte thermostabile Enzym-Mischung Sie besteht aus *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase, *Pyrococcus sp.* DNA-Polymerase, einem hochaffinen, monoklonalen Anti-Taq Antikörper und zusätzlichen, die PCR unterstützenden Faktoren. Opti Taq DNA-Polymerase wird aus hochreinen, rekombinanten Enzym- und Antikörperpräparationen hergestellt.
- Die Enzym-Mischung besitzt 3'→5' Korrekturleseaktivität (proofreading) und erzielt damit höhere Genauigkeit, stärkere Prozessivität und bessere Ausbeuten im Vergleich zu unmodifizierter Taq DNA-Polymerase (1).
- Die Amplifikationsleistung ist identisch zu Perpetual Opti Taq DNA Polymerase mit getrennt abgefüllten Reaktionskomponenten (Best. Nr. E2720). 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.
- Katalysiert die Polymerisation von Nukleotiden zu Duplex-DNA in 5'→3' Richtung bei Anwesenheit von Magnesiumionen.
- Besitzt 5'→3' Exonuklease-Tätigkeit.
- PCR-Produkte können sowohl einen -A Überhang (ca. 5 % der Produkte) als auch stumpfe Enden (blunt ends) (ca. 95 % der Produkte) besitzen. Im Anschluß sind sowohl TA- als auch Blunt-Klonierungsreaktionen möglich.
- Perpetual 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 20 kb erhalten werden.

Perpetual Opti Taq PCR Master Mix (2x), Packungsinhalt:

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

Perpetual Opti Taq PCR Master Mix (2x):

Der Mix enthält 2 x Pol Buffer B mit 3 mM MgCl₂ und 0.4 mM je dNTP. Finale Konzentrationen: 1.5 mM MgCl₂ 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 PCR-Aliquots direkt auf Agarose-Gele 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. Cline J. et al. (1996) *Nucleic Acid Res.* 24 (18) 3546-3551.



Perpetual Opti Taq PCR Master Mix (2x) PCR PROTOKOLL (1)

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
Perpetual Opti Taq PCR Master Mix (2x)	25 µl	1.25 U Perpetual Opti Taq DNA Polymerase 1 x Reaktionspuffer (1.5 mM MgCl ₂) 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	-

Hinweise:

- Erster Hauptsatz der PCR:** PCR ist vergleichbar zu homöopathischen Prozessen. Sie funktioniert am besten, solange alle Komponenten nur in homöopathischen Dosen eingesetzt werden. "Viel hilft viel" gilt nicht für PCR.
- Konzentrationsunterschiede vermeiden.** Perpetual Opti Taq PCR Master Mix (2x) vollständig auftauen, vorsichtig vortexen und kurz an zentrifugieren, um lokale Unterschiede in der Salzkonzentration zu vermeiden.
- Raumtemperatur.** Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der Perpetual Opti Taq DNA Polymerase zunächst durch den monoklonalen Antikörper reversibel inhibiert wird.
- Primermix.** Primer können entweder separat oder als Primermix zugefügt werden.
- Mischen.** DNA-Proben kurz vortexen und an zentrifugieren.
- Zyklus nicht vorheizen.** Ein Vorheizen des Thermocycler-Blocks auf 94-95°C vor Hineinstellen der PCR-Reaktionsansätze ist nicht erforderlich - im Unterschied zu Nicht-"HotStart" DNA Polymerasen.
- MgCl₂.** Die Standard-Endkonzentration von MgCl₂ in PCR-Reaktionen beträgt 1.5 mM (wie in 1 x Perpetual Opti Taq PCR Mastermix bereitgestellt) - für die meisten PCR Reaktionen optimal. 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.** 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 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.
- Lange Amplikons:** 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.
- Hochwertige Vorlagen-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).
- Lagerung hochmolekularer DNA:** 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.
- Dünnwandige Reaktionsgefäße:** Benutzen Sie für die Amplifikation langer PCR Fragmente ausschließlich dünnwandige Plastik-Reaktionsgefäße mit einem Füllvolumen von 0.2 ml.

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

(MW pro bp: siehe Dolezel et al. Cytometry, 2003, Vol. 51A, 2, 127-8)



Perpetual Opti Taq PCR Master Mix (2x) PCR PROTOKOLL (2)

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:

- 1. 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.
- 2. Lange PCRs - Primerspezifikationen:** 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.
- 3. Lange PCRs - Denaturierungsparameter:** 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.
- 4. Lange PCRs - Elongationstemperatur:** 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.
- 5. Lange PCRs - Dauer des Elongationsschrittes:** 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.
- 6. Peltierelemente des PCR-Cyclers schonen.** Unnötig lange Kühlphasen auf 4°C am Ende des PCR-Programmes führen zu starker Beanspruchung der Peltierelemente Ihres PCR-Cyclers. Schonend Sie die Peltierelemente Ihres PCR-Cyclers vor unnötigem Verschleiß, indem Sie die PCR-Reaktionen nach Ablauf des PCR-Programmes möglichst kurzfristig entnehmen. Alternativ kann eine Kühltemperatur auf 8°C gewählt werden. Die PCR-Amplifikons sollten dennoch zeitnahe entnommen und aufgearbeitet werden, da sie im PCR-Ansatz der 3'-5'- Exonukleaseaktivität der *Pyrococcus sp.* DNA Polymerase ausgesetzt sind.