

Color Perpetual *Taq* Master Mix (2x)

PCR System mit monoklonalem Antikörper für automatisierten "Hot Start"

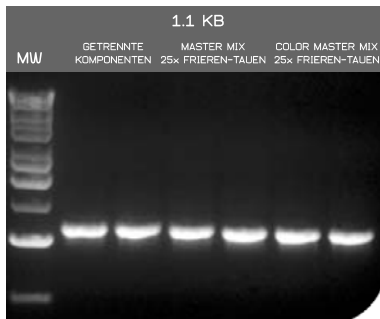
Color Perpetual *Taq* Master Mix (2x) (*Taq* DNA Polymerase)

Artikel Nr.	Größe
E2745-01	100 Reaktionen je 50 µl
E2745-02	200 Reaktionen je 50 µl
E2745-03	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, mehr als 12 Monate haltbar) oder bei +4°C bis zu zwei Monate.



PCR Amplifikation unter Verwendung von EURx Color Perpetual *Taq* PCR Master Mix.

Ein Amplikon einer Länge von 1.1 kb (humanes CCR5 Gen) wurde mit Standard- (nicht vorgemischter) Perpetual *Taq* DNA Polymerase und mit Color Perpetual *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 *Taq* DNA Polymerase, Pol Buffer B und dNTPs

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

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

Um eine **vollständige Denaturierung des Antikörpers** nach Durchlaufen der ersten Temperaturrampe zu gewährleisten, wird empfohlen, zu **Beginn der PCR-Reaktion einen initialen Denaturierungsschritt für 3 bis 5 Minuten bei 95°C einzufügen.**

Color Perpetual *Taq* DNA Polymerase Master Mix, mit zwei PCR-neutralen Farbstoffen zur direkten Gelbeladung. Stabile und reproduzierbare Amplifikationsleistung auch nach mehr als 25 Gefrier-/Auftau-Zyklen und 12-monatiger Lagerung. Vorkomplexiert mit einem hochwertigen, spezifischen monoklonalen Anti-*Taq* Antikörper für automatisierbaren "Hot Start".

Beschreibung:

- Color Perpetual *Taq* PCR Master Mix (2x) ist eine gebrauchsfertig abgestimmte Mischung aus Perpetual *Taq* DNA Polymerase, optimiertem Reaktionspuffer, MgCl₂, dNTPs und zwei PCR-neutralen Farbstoffen zur direkten Gelbeladung.
- 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.
- Die Amplifikationsleistung ist identisch zu reiner Perpetual *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.
- Color Perpetual *Taq* besteht aus *Taq* DNA-Polymerase, die reversibel an einen monoklonalen anti-*Taq* Antikörper gebunden ist. Die Replikationsaktivität des Enzyms ist für die Zeitspanne bis zum ersten Denaturierungsschritt blockiert - wichtig, um Produkte unspezifischer Primerextensionen wie Primer-Dimere zu verhindern. Ermöglicht das bequeme Zusammenpipettieren von PCR - Reaktionen bei Raumtemperatur.
- Der monoklonale anti-*Taq* Antikörper denaturiert erst bei einer Temperatur von 70°C irreversibel und besitzt somit hohe thermische Stabilität.
- Die zunächst durch den monoklonalen Antikörper blockierte DNA Polymerase-Aktivität wird während des einleitenden Denaturierungsschrittes wieder hergestellt. Hierzu muss der Reaktionsmix für zwei Minuten auf 94-95°C erhitzt werden.
- "Hot Start" PCR kann PCR-Spezifität, Ausbeute und Empfindlichkeit im Vergleich mit herkömmlichen PCR-Reaktionen erhöhen.
- Sowohl die erhöhte Spezifität als auch die Reduktion fehlerhafter Primerbindung (mispriming) verbessern die Qualität der Multiplex-PCR.
- Repliziert DNA bei 72°C (bzw. mit verminderter Geschwindigkeit auch bei niedrigeren Temperaturen). Die Halbwertszeit bei 95°C beträgt 40 min (1,2).
- Besitzt 5'→3' Exonuklease-Tätigkeit.
- Besitzt keine 3'→5' Exonuklease Aktivität.
- Fügt ein überhängendes A am 3'-Ende an (betrifft etwa 5 % der Amplikons).
- Color Perpetual *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.

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

1. Color Perpetual *Taq* PCR Master Mix (2x)
2. PCR-Wasser, nukleasefrei

Color Perpetual *Taq* PCR Master Mix (2x):

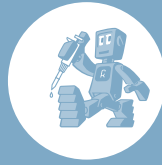
Der Mix enthält 2 x Pol Buffer B mit 3 mM MgCl₂ und 0.4 mM je dNTP. Finale Konzentrationen: 1.5 mM MgCl₂ und 0.2 mM je dNTP.

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.

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.



Color Perpetual *Taq* PCR Master Mix (2x) PCR PROTOKOLL

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
Color Perpetual <i>Taq</i> PCR Master Mix (2x)	25 µl	1.25 U Perpetual <i>Taq</i> 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
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	< 0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Auf 50 µl	-
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

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

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:** 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.** Color Perpetual *Taq* PCR Master Mix (2x) vollständig auftauen, vorsichtig vortexen und kurz anzenrifugieren, um lokale Unterschiede in der Salzkonzentration zu vermeiden.
- Raumtemperatur.** Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der *Taq* DNA Polymerase zunächst durch den monoklonalen Antikörper reversibel inhibiert wird.
- Primermix.** Primer separat oder als Primermix zufügen.
- Proben mischen.** Kurz vortexen und anzenrifugieren.
- PCR-Block nicht vorheizen.** Kein Vorheizen des Thermocycler-Blocks auf 94-95 °C vor Hineinstellen der PCR-Reaktionsansätze 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 Color Perpetual *Taq* PCR Mastermix enthalten) - für die meisten PCR Reaktionen optimal. Wenn höhere MgCl₂ Konzentrationen benötigt werden, sollte eine 25 mM MgCl₂ Stammlösung hergestellt werden (kann bei uns angefordert werden). 1 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung fügt 25 nmol MgCl₂ zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die Mg²⁺-Konzentration einer 50 µl Reaktion um 0.5 mM.
- Integrierter farbiger Ladepuffer.** Bei Verwendung von Color Perpetual *Taq* Master Mix (2x) können PCR-Reaktionen ohne nachträglichen Zusatz eines Auftragspuffers auf ein Gel geladen werden. Dem Enzymmix sind zwei inerte Farbstoffe beigefügt (rot und gelb), die sich während der Elektrophorese auftrennen. Bezogen auf ein 1% [w/v] Agarosegel migriert der rote Farbstoff etwa auf der Höhe eines 600 bp DNA Fragmentes, der gelbe Farbstoff wandert schneller als 20 bp und markiert somit die Front des Gels. Die meisten nachfolgenden Anwendungen werden von den Farbstoffen nicht beeinträchtigt (Ausnahme: Fluoreszenz-Methoden). Trotzdem lautet die Empfehlung, PCR Produkte vor nachfolgenden enzymatischen Reaktionen aufzureinigen.
- PCR-Additiva.** Es ist meistens nicht notwendig, Additive oder "Enhancer" zu den PCR-Reaktionen hinzu zu fügen. Lediglich für einige, schwierige DNA-Vorlagen, wie GC-reiche Reaktionen und sehr lange Ziel-DNA-Abschnitte über 30 kb Länge kann die Zugabe von Additiven wie DMSO einen positiven Einfluss auf den Verlauf der PCR-Reaktion nehmen.
- 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 10⁵ Molekülen.

Hinweise:

- Initiale Denaturierung.** Eine einleitende Denaturierung von 2 min Dauer ist erforderlich, um den Antikörper zu denaturieren und die Aktivität der DNA Polymerase wieder herzustellen.
- 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.
- 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.