

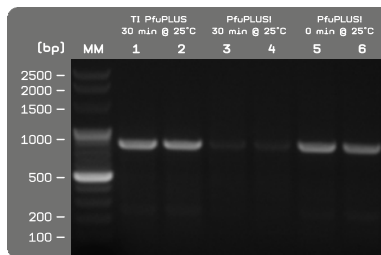
TI *Pfu* Plus! DNA Polymerase

Pfu DNA Polymerase (*Pyrococcus furiosus*) MODIFIZIERT, REKOMBINANT

Artikel Nr.	Größe
E1113-01	100 Einheiten
E1113-02	500 Einheiten
E1113-03	2500 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



PCR Amplifikation unter Verwendung von EURx *tiPfuPlus!* DNA Polymerase – Demonstration des Einflusses von "HotStart" auf PCR-Spezifität und PCR-Ausbeute.

Ein PCR-Amplikon von 0,82 kb Länge aus dem Gen für humanes beta-Globin wurde mit EURx *PfuPlus!* (kein "Hot Start"-Enzym) und mit EURx *tiPfuPlus!* ("Hot Start"-Enzym) amplifiziert. Um die Auswirkung von "Hot Start" auf PCR-Spezifität und PCR-Ausbeute zu demonstrieren, wurden "Hot Start"-Reaktionen (Spur 1,2) und Nicht-"Hot Start" Reaktionen (Spur 3, 4) für 30 min bei 25°C inkubiert, bevor der PCR-Lauf gestartet wurde.

MM: Molekulargewichtsmarkierung - EURx Perfect 100 bp DNA Ladder (E3134)

Spuren 1, 2: PCR-Reaktionen mit 2.5 U *tiPfuPlus!* DNA Polymerase (E1113, "Hot Start" mit TI-Inhibitor); Reaktion wurde vor PCR für 30 min bei 25°C inkubiert.

Spuren 3, 4: PCR-Reaktionen mit 2.5 U *PfuPlus!* DNA Polymerase (E1118, kein "Hot Start"); Reaktion wurde vor PCR für 30 min bei 25°C inkubiert.

Spuren 5, 6: Kontrolle: PCR-Reaktionen mit 2.5 U *PfuPlus!* DNA Polymerase (E1118, kein "Hot Start"); Reaktion wurde auf Eis pipettiert und nicht für 30 min bei 25°C inkubiert.

Äußerst thermostabile DNA-Polymerase-Mischung, formuliert für die effiziente punktgenaue Mutagenese (site-directed mutagenesis) und für die Synthese von DNA-Produkten bis zu einer Länge von mehr als 20 kb unter Beibehaltung der Korrekturleseaktivität.

Beschreibung:

- "HotStart" PCR-Enzymmix, wird bei moderaten Temperaturen mittels eines temperaturabhängigen Inhibitors (TI) blockiert. Damit ist es möglich, PCR-Assays bei Raumtemperatur zusammenzufügen. Nach Erhitzen wird die Polymeraseaktivität unter den Temperaturbedingungen der PCR-Assays vollständig freigesetzt.
- *tiPfuPlus!* ermöglicht eine deutliche Steigerung der PCR-Spezifität, Sensitivität und Ausbeute im Vergleich zu konventioneller PCR..
- *tiPfuPlus!* ist eine modifizierte und optimierte, sehr temperaturstabile *Pfu* DNA-Polymerase (1). Das System enthält zusätzliche, die PCR unterstützende Faktoren.
- Hergestellt aus hochreinen, rekombinanten Enzymen.
- Das Enzym katalysiert bei Anwesenheit von Magnesium-Ionen die Polymerisation von Nukleotiden zu Duplex-DNA in 5' → 3' Richtung.
- Das Enzym besitzt 3' → 5' Korrekturleseaktivität ("proofreading") und ermöglicht eine Steigerung der Genauigkeit um den Faktor 10 im Vergleich zu *Taq* DNA-Polymerasen (2).
- Ein Bestandteil der *tiPfuPlus!* DNA - Polymerase ist ein spezieller, die Polymerase unterstützender Faktor. Mit Hilfe dieses Faktors werden sowohl die Produktausbeute als auch die Fähigkeit maximiert, sehr lange Amplifikate zu vervielfältigen.
- Die erhöhte Amplifikationsaktivität der *tiPfuPlus!* ermöglicht es, die Anzahl an PCR-Zyklen wie auch die erforderliche Konzentration an DNA-Kopiervorlagen ("Template-DNA") zu minimieren.
- *tiPfuPlus!* DNA-Polymerase wird in PCR-Reaktionen eingesetzt, bei denen hohe Genauigkeit benötigt wird; in PCR von GC-reichen Regionen oder in Bereichen mit problematischen Sekundärstrukturen; in Primerextensionen bei erhöhten Temperaturen und zur Erzeugung von Produkten mit stumpfen Enden (blunt ends) zum Einsatz in Ligationsreaktionen. Das System findet auch Anwendung bei der Amplifikation von PCR- und Primerextensionsreaktionen zur Erzeugung von Produkten einer Länge von mehr als 20 kb Länge.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

50 mM Tris-HCl (pH 8.0 bei 22°C), 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 50 % [v/v] Glycerin und Stabilisatoren.

10 x Reaktionspuffer:

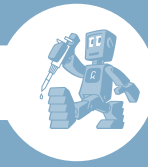
10 x *Pfu* Puffer:
Der Puffer enthält 15 mM MgSO₄.

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. Lundberg, K., Shoemaker, D., Adams, M., Short, J., Sorge, J. und Mathur E. (1991) *Gene* 108, 1.
2. Cline, J., Braham, J. und Hogrefe, H. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24, 3546.
3. Kaledin, A.S., Sliusarenko, A.G. und Gorodetskii, S.I. (1980) *Biokhimiya* 45, 644.



TI *Pfu* Plus! DNA Polymerase PCR PROTOKOLL

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
10 x <i>Pfu</i> Buffer (enthält 15 mM MgSO ₄)	5 µl	1x
dNTP Mix (je 5mM)	2.0-2.5 µl	0.2-0.25 mM je dNTP
Vorwärts-Primer	Variabel	0.2-0.5 µM
Reverser Primer	Variabel	0.2-0.5 µM
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	<0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Variabel	-
ti <i>Pfu</i> Plus! DNA Polymerase, 5 U/µl	0.5 µl	2.5 U
Gesamtvolumen	50 µl	-

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) für Produkte einer Länge bis 6 kb

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende Denaturierung	94-95°C	2-5 min	1
Denaturierung	94-95°C	20-30 s	25-35
Annealing	50-68°C	30 s	
Extension	72°C	1 min/1 kb	
Finale Extension	72°C	7 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	1

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm) für Produkte einer Länge >6 kb

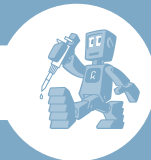
Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende Denaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	10-15 s	10
Annealing	60-68°C	30 s	
Extension	68°C	1 min/1 kb	
Denaturierung	94°C	10-15 s	25-35
Annealing	60-68°C	30 s	
Extension	68°C	1 min/1 kb + 20 s pro zusätzl. Zyklus	
Finale Extension	68°C	7 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	1

Hinweise:

- Konzentrationsunterschiede vermeiden:** Um lokale Unterschiede in der Salzkonzentration zu vermeiden, sollten alle Bestandteile der PCR Reaktion vollständig aufgetaut und vor Benutzung gründlich gemischt werden, z.B. durch Vortexen. Das ist besonders wichtig für alle magnesiumhaltigen Lösungen (wie 10x facher Puffer), da solche Lösungen im gefrorenen Zustand Konzentrationsgradienten bilden.
- Pipettieren bei Raumtemperatur.** Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der DNA Polymerase durch den temperaturabhängigen Inhibitor (TI) bei Raumtemperatur inhibiert wird. Gut mischen!
- Kein vorgeheizter PCR-Block erforderlich.** Wegen des "HotStart" TI-Inhibitors ist es nicht notwendig, die PCR-Reaktionen in einen vorgeheizten PCR-Block zu stellen.
- Enzym als letzte Komponente zufügen:** ti*Pfu*Plus! DNA Polymerase sollte die letzte Komponente sein, die zum Reaktionsansatz zugefügt wird. In Abwesenheit von dNTPs kann die Korrekturlese- ("proofreading" - Exonuklease) Aktivität des Enzyms die Degradation von PCR-Primern verursachen.
- MgSO₄:** Die Standard-Endkonzentration von MgSO₄ in PCR-Reaktionen beträgt 1.5 mM (wie in Pol Puffer B bereitgestellt) - für die meisten PCR Reaktionen bei einer dNTP-Konzentration von 0,2 mM optimal. In den meisten PCR Reaktionen werden mit dieser Konzentration zufriedenstellende Resultate erzielt. In einigen Fällen ist es jedoch notwendig, die optimale MgSO₄-Konzentration experimentell zu bestimmen. Für diesen Zweck ist Puffer A vorgesehen. 1 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung fügt 25 nmol zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die MgSO₄-Konzentration einer 50 µl Reaktion um 0.5 mM. Erhöhung der MgSO₄-Konzentration erhöht die PCR-Ausbeute, aber vermindert die Reaktionspezifität (mehr Banden, aber auch mehr unerwünschte Banden werden amplifiziert). Verminderung der MgSO₄-Konzentration führt zu niedriger PCR-Ausbeute, aber erhöht die Spezifität der Reaktion.
- dNTP-Konzentration:** Die empfohlene dNTP-Konzentration für die PCR-Reaktion hängt von der Amplikon-Länge ab und sollte empirisch bestimmt werden. Gute Ausbeuten werden üblicherweise mit einer dNTP-Konzentration von 0.25 mM erzielt.
- Enzymmenge ti*Pfu*Plus! :** Die empfohlene Menge an ti*Pfu*Plus! DNA Polymerase pro Reaktion beträgt 2,5 U je 50 µl PCR-Reaktionsvolumen. Für die meisten Anwendungen ist das Enzym im Überschuss vorhanden und zufriedenstellende Resultate werden erzielt. Eine zu hohe Menge an eingesetztem Enzym kann zu Artefakten, beispielsweise zu verschmierten Banden o.ä. führen.
- 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 Additiva wie DMSO einen positiven Einfluss auf den Verlauf der PCR-Reaktion nehmen. Sinnvolle Konzentrationsbereiche für DMSO sind 2%-8% [v/v], die empfohlene Anfangskonzentration (falls überhaupt erforderlich) beträgt 3% [v/v]
- Optimale Menge an DNA-Vorlage:** Die benötigte Menge an Vorlagen ("Template"-) DNA Molekülen hängt von der Art der zu amplifizierenden DNA-Vorlage ab. Generell wird empfohlen, etwa folgende Mengen einzusetzen: 50-250 ng genomische DNA, 0.1-10 ng Plasmid-DNA, 1-20 ng Phagen-DNA oder 10-100 ng von solchen chromosomalen Genen, die in mehreren Wiederholungen vorliegen.

Hinweise:

- Primerbindungstemperatur:** 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 - Primerspezifikationen:** Um die Reaktionspezifität 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.
- 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 Denaturierungsschritt 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.
- Lange PCRs - Elongationstemperatur:** Für die Amplifikation von PCR-Produkten einer Länge von mehr als 6 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.
- Lange PCRs - Dauer des Elongationsschrittes:** Sollen PCR-Produkte einer Länge von mehr als 6 kb erzeugt werden, wird sehr empfohlen, mit Beginn des 11. Zyklus die Zeitdauer des Elongationsschrittes je Zyklus um 20 s zu erhöhen.



TI *Pfu* Plus! DNA Polymerase

PROTOKOLL FÜR PUNKTGENAUE MUTAGENESE ("SITE DIRECTED MUTAGENESIS")

Ansetzen der Mutagenese – Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
10 x <i>Pfu</i> Buffer (enthält 20 mM MgSO ₄)	5 µl	1x
dNTP Mix (je 5mM)	2.0-2.5 µl	0.2-0.25 mM je dNTP
Mutagenese-Primer #1	Variabel	0,2 µM
Mutagenese-Primer #2	Variabel	0,2 µM
Plasmid DNA Vorlage ("Template")	Variabel	5-50 ng
Vorlagen - ("Template") Plasmid - DNA	Variabel	5-50 ng
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Variabel	-
ti <i>Pfu</i> Plus! DNA Polymerase, 5 U / µl	0.5 µl	2.5 U
Gesamtvolumen	50 µl	-

Hinweise:

- Konzentrationsunterschiede vermeiden:** Um lokale Unterschiede in der Salzkonzentration zu vermeiden, sollten alle Bestandteile der PCR Reaktion vollständig aufgetaut und vor Benutzung gründlich gemischt werden, z.B. durch Vortexen. Das ist besonders wichtig für alle magnesiumhaltigen Lösungen (wie 10x facher Puffer), da solche Lösungen im gefrorenen Zustand Konzentrationsgradienten bilden.
- Pipettieren bei Raumtemperatur.** Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der DNA Polymerase durch den temperaturabhängigen Inhibitor (TI) bei Raumtemperatur inhibiert wird. Gut mischen!
- Kein vorgeheizter PCR-Block erforderlich.** Wegen des "HotStart" TI-Inhibitors ist es nicht notwendig, die PCR-Reaktionen in einen vorgeheizten PCR-Block zu stellen.
- Enzym als letzte Komponente zufügen:** ti*Pfu*Plus! DNA Polymerase sollte die letzte Komponente sein, die zum Reaktionsansatz zugefügt wird. In Abwesenheit von dNTPs kann die Korrekturlese- ("proofreading" = Exonuklease) Aktivität des Enzyms die Degradation von PCR-Primern verursachen.
- Enzymmenge ti*Pfu*Plus!:** Die empfohlene Menge an ti*Pfu*Plus! DNA Polymerase pro Reaktion beträgt 2.5 U je 50 µl PCR-Reaktionsvolumen. Für einzelne Anwendungen kann es notwendig sein, die Polymerase-Menge weiter zu optimieren.
- Optimale Menge an Ziel-DNA:** Zur Durchführung des Mutagenese - Protokolls werden normalerweise zwischen 5 und 50 ng Plasmid-DNA benötigt, um zufrieden-stellende Ergebnisse zu erzielen.
- Plazierung der beabsichtigten Mutation:** Beide zur Mutagenese eingesetzte Primer müssen die gewünschte Mutation tragen und an die selbe Sequenz auf den gegenüberliegenden DNA-Strängen binden. Die gewünschte, einzuführende Mutation liegt idealerweise in der Mitte des Primers. Zwischen der mutierten Stelle und den Enden der Primer sollten mindestens 10 bp genau passende Basenpaare liegen.
- Menge eingesetzter Mutagenese-Primer:** Die Mutagenese - Primer sollten in einer Konzentration von 0,2 µM je Primer und Reaktion eingesetzt werden.

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm):

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende Denaturierung	95°C	1 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	18
Annealing	55-60°C	30 s-1 min	
Extension	68°C	1 min/1 kb	
Finale Extension	68°C	7 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	1

Hinweise:

- Primerbindungstemperatur:** Die Annealing-Temperatur liegt meistens im Bereich zwischen 55-60°C. Für bestimmte DNA-Vorlagen ("Templates") kann die optimale Primerbindungstemperatur abweichen. Als guter Ausgangspunkt für weitere Optimierungen kann eine Annealing-Temperatur von 55°C gewählt werden.