

# Color Taq DNA Polymerase

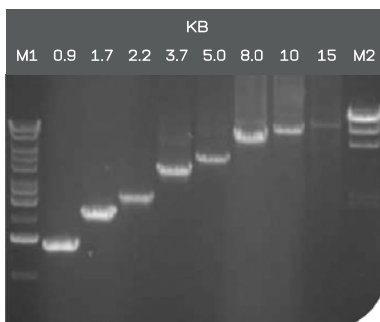
## Rekombinant

### Taq DNA Polymerase (*Thermus aquaticus*)

Artikel Nr.	Größe
E2510-01	200 Einheiten
E2510-04	500 Einheiten
E2510-02	1000 Einheiten
E2510-03	5000 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 MgCl<sub>2</sub>, 200 µM jeweils von dATP, dCTP, dGTP, dTTP (ein Gemisch aus unmarkiertem und [<sup>3</sup>H]-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 **Color Taq** DNA-Polymerase. Spur M: Molekularer Größenmarker EURx Perfect™ 1-kb-Leiter (E3130-02). Spuren: 1.1 bis 9.3 kb: PCR-Amplifikation unter Verwendung von Puffer B mit 0.2 mM dNTPs und 1,25 U EURx **Color Taq** DNA Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

**Thermostabile DNA-Polymerase für die Synthese von DNA bei hohen Temperaturen. Dem Enzym sind zwei inerte Farbstoffe zugesetzt, die es ermöglichen, das PCR Produkt ohne Zusatz eines Gel-Ladepuffers auf ein Agarosegel aufzutragen.**

#### Beschreibung:

- *Taq* DNA-Polymerase ist ein thermostabiles Enzym aus *Thermus aquaticus* mit einer Größe von etwa 94 kDa.
- Hochreines, rekombinantes Protein.
- Das Enzym repliziert DNA in einem breiten Temperaturbereich mit einem Aktivitätsoptimum bei 72°C - 74°C. Bei 95°C besitzt das Enzym eine Halbwertszeit von 40 Minuten (1, 2).
- Katalysiert die Polymerisation von Nukleotiden zu Duplex-DNA in 5'→3' Richtung bei Anwesenheit von Magnesiumionen.
- Besitzt 5'→3' Exonuklease-Tätigkeit.
- Besitzt keine 3'→5' Exonuklease Aktivität ("proofreading"). Wird an ein DNA-Molekül während der Amplifikation ein fehlerhaft paarendes Nukleotid eingebaut, kann es von *Taq* DNA Polymerase nicht weiter verlängert werden.
- Geeignet für PCR-Reaktionen, bei denen nicht paarende, gegenüberliegende Nukleotide ("mismatches") erhalten bleiben sollen.
- Fügt ein überhängendes A am 3'-Ende an (betrifft etwa 5 % der Amplikons). Etwa 95 % der Amplikons besitzen ein stumpfes ("blunt") Ende.
- Fügt ein überhängendes A am 3'-Ende an (betrifft etwa 5 % der Amplikons).
- *Color 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.
- Die beigefügten Markierungsfarbstoffe bringen mehrere Vorteile:
  - + optische Überprüfung, ob Polymerase zur Reaktion hinzugefügt wurde,
  - + optische Kontrolle, ob die Reaktion vollständig durchmischt wurde,
  - + enthält Markerfarbstoffe für die Gelelektrophorese,
  - + wirkt sich nicht negativ auf nachfolgende Arbeitsschritte aus wie Ligation, Transformation, automatisierte DNA-Sequenzierung, Restriktionsverdau. Ausnahme: Nicht geeignet für alle nachfolgenden Arbeitsschritte im Zusammenhang mit Absorptionsmessungen und Fluoreszenzanregung.

#### Lagerungspuffer (Storage Buffer):

20 mM Tris-HCl (pH 8.0 bei 22°C), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 50 % [v/v] Glycerin.

#### 10 x Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

##### 10 x Pol Buffer A (Optimierungspuffer ohne MgCl<sub>2</sub>):

Dieser Puffer enthält kein MgCl<sub>2</sub> und erlaubt die Optimierung der MgCl<sub>2</sub> - Konzentration.

##### 10 x Pol Buffer B (generelle Anwendung, bis zu 10 kb):

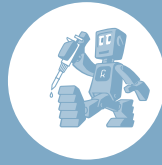
Der Puffer enthält 15 mM MgCl<sub>2</sub> und ist für den Gebrauch mit 0.1 - 0.2 mM je dNTP optimiert.

#### 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. Chien, A., Edgar, D.B. und Trela, J.M. (1976) *J. Bacteriol.* 127, 1550.
2. Kaledin, A.S., Sliusarenko, A.G. und Gorodetskiy, S.I. (1980) *Biokhimiya* 45, 644.



# Color Taq DNA Polymerase

## PCR PROTOKOLL

### Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
10 x Pol Buffer A oder 10 x Pol Buffer B	5 µl	1x
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1-5 µl bei Verwendung von 10 x Pol Buffer A oder 0 µl bei Verwendung von 10 x Pol Buffer B	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
Color Taq DNA Polymerase, 1 U/µl	1.25µl	1.25 U
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	< 0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Variabel	-
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: 10<sup>4</sup> Kopien der DNA-Vorlage  
Maximal: 0,5 µg DNA oder weniger

### 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:** Die PCR-Reaktion ist eine Art homöopathischer Prozess, der am besten funktioniert, sobald *alle* Komponenten nur in homöopathischen Dosen eingesetzt werden.
- 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 10-fach Puffer), da solche Lösungen im gefrorenen Zustand Konzentrationsgradienten bilden.
- Auf Eis:** Die Reaktionsansätze sollten auf Eis pipettiert werden, da Taq DNA Polymerase auch bei moderaten Temperaturen Aktivität besitzt.
- Zyklus vorheizen:** Um die Bildung von Primer-Dimeren zu minimieren, wird empfohlen, die PCR Reaktionen in einen PCR Cycler zu stellen, dessen Block auf 94-95°C vor geheizt wurde.
- MgCl<sub>2</sub>:** Die Standard-Endkonzentration von MgCl<sub>2</sub> in PCR-Reaktionen beträgt 1.5 mM (wie in Pol Puffer B bereitgestellt) - für die meisten PCR Reaktionen optimal. In den meisten PCR Reaktionen werden mit dieser Konzentration zufriedenstellende Resultate erzielt. In einigen Fällen ist es jedoch notwendig, die optimale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration experimentell zu bestimmen. Für diesen Zweck ist Puffer A vorgesehen. 1 µl einer 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung fügt 25 nmol zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration einer 50 µl Reaktion um 0.5 mM. Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration erhöht die PCR-Ausbeute, aber vermindert die Reaktionsspezifität (mehr Banden, aber auch mehr unerwünschte Banden werden amplifiziert). Verminderung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration führt zu niedriger PCR-Ausbeute, aber erhöht die Spezifität der Reaktion.
- Integrierter farbiger Ladepuffer:** Bei Verwendung von Color Taq DNA Polymerase können PCR-Reaktionen ohne nachträglichen Zusatz eines Auftragspuffers auf ein Gel geladen werden. Der Polymerase 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.
- Enzymmenge Color Taq:** Die empfohlene Menge an Color Taq 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. Eine zu hohe Menge an eingesetztem Enzym kann zu Artefakten, beispielsweise zu verschmierten Banden führen.
- Mindestmenge Color Taq:** Mindestens 0.75 U Color Taq DNA Polymerase müssen je 50 µl Reaktionsvolumen eingesetzt werden, um das PCR Produkt direkt, ohne Ladepuffer, auf ein Agarosegel auftragen zu können.
- Kopienzahl DNA-Vorlage:** Die optimale Menge an Vorlagen ("Template-") DNA Molekülen beträgt etwa 10<sup>4</sup> 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<sup>11</sup> Molekülen, 1 µg von *E. coli* genomischer DNA entspricht 2 x 10<sup>9</sup> Molekülen, 1 µg von menschlicher genomischer DNA entspricht 3 x 10<sup>5</sup> Molekülen. Zu hohe Mengen eingesetzter Vorlagen-DNA (> 0,5 µg) können die PCR-Ausbeute beeinträchtigen bzw. die PCR-Reaktion inhibieren.

### Hinweise:

- Primerbindung:** Die Primerbindungs (Annealing-) Temperatur sollte auf jedes Primerpaar optimal angepasst werden. Ausgangspunkt sind auf den Primer-Datenblättern angegebene Schmelztemperaturen T<sub>m</sub>. Die optimale Annealing Temperatur kann ober- oder unterhalb des abgeschätzten T<sub>m</sub> liegen. Als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen sollte die Annealing-Temperatur zunächst um 5°C unterhalb T<sub>m</sub> 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.