

## Datenblatt

### Hotstart-Taq-DNA-Polymerase 500 U

(Kat.-Nr. CH1020,0500)

(Nur für Forschung und In-vitro-Anwendungen)

---

|  |  |
|--|--|
| Mindestens haltbar bis:                    | 00/00  |
| Aussehen:                                  | klare Flüssigkeit  |
| Farbe:                                     | transparent  |
| Lieferumfang:<br>(farbige Deckelcodierung) | 100 µL Hotstart-Taq-DNA-Polymerase (500 U), Charge 000000<br>1.500 µL Reaktionspuffer A1 (10x), Charge 000000<br>1.500 µL Reaktionspuffer A2 (10x), Charge 000000<br>1.500 µL Reaktionspuffer B1 (10x), Charge 000000<br>1.500 µL Reaktionspuffer B2 (10x), Charge 000000<br>1.500 µL MgCl <sub>2</sub> -Lösung (25 mM), Charge 000000<br>200 µL Lösung S (10x), Charge 000000 |

---

**Menge:** 500 Units in 100 µL

**Konzentration:** 5 Units/µL

**Herkunft:** Ursprungsform ist die thermostabile DNA-Polymerase, die aus *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Das vorliegende Enzym ist eine modifizierte Variante, die rekombinant in *E. coli* exprimiert wurde. Die Polymerase wird durch Inkubation bei 95 °C über einen Zeitraum von 15 min aktiviert. Das verhindert die unspezifische Bindung von Primern sowie die Bildung von Primer-Dimeren bei niedrigen Temperaturen zu Beginn der PCR.

**Unit:** Eine Unit ist die Enzymmenge, die benötigt wird, um 10 nmol dNTP in 30 min bei 74 °C in eine säureunlösliche Form umzuwandeln.

**Lager- und Verdünnungspuffer:** 50 % Glycerol (v/v), 20 mM Tris•HCl pH 8.7 bei 25°C, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA und Stabilisatoren.

**Enzymaktivitäten:** Hotstart-Taq-DNA-Polymerase ist eine hochprozessive 5' → 3' DNA-Polymerase mit 5' → 3' Exonuklease-Aktivität. Eine 3' → 5' Exonuklease-Aktivität fehlt vollständig. Zusätzlich fügt das Enzym einzelne Nukleotide (fast ausschließlich Adenosin) an die 3'-Enden der DNAs an, so daß eine TA-Klonierung ohne weitere Modifizierungen möglich ist.

**Anwendungs- und Qualitätskontrolle:** Primer-Extensions-Reaktionen: Das Enzym ist frei von Nicking- und Primer-Aktivitäten sowie von Exonukleasen und unspezifischen Endonukleasen. SDS/PAGE: 95-kD-Bande, Reinheit: >98 %. Aktivität und Stabilität wurden mittels PCR getestet. Die Fehlerrate pro Nukleotid und Zyklus beträgt ~2,5 x 10<sup>-5</sup>, die Genauigkeit ~4 x 10<sup>-4</sup>. Die Halbwertszeit bei 95 °C liegt bei 90 min.

**Reaktionspuffer:**

- 10x Reaktionspuffer A1 (frei von Mg<sup>2+</sup> und Detergenzien): Tris•HCl, KCl
- 10x Reaktionspuffer A2 (frei von Mg<sup>2+</sup>): Tris•HCl, KCl, Detergenzien, Glycerin
- 10x Reaktionspuffer B1 (frei von Mg<sup>2+</sup> und Detergenzien): Tris•HCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 10x Reaktionspuffer B2 (frei von Mg<sup>2+</sup>): Tris•HCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Detergenzien

Als Standardpuffer werden die Reaktionspuffer A1 und B2 empfohlen. Für weitere Optimierungen stehen die Puffer A2 und B1 zur Verfügung.

**Reaktionspuffer und 25 mM MgCl<sub>2</sub> routinemäßig bei - 20 °C lagern!**

**Additiv:** Lösung S (10x) eignet sich zur Verbesserung der Amplifikationsergebnisse bei schwierigen DNA-Templates (z. B. GC-reiche DNA-Templates). Die Lösung sollte nur in einer definierten Konzentration (1x, 2x oder 3x) und zusätzlich zu einem der Reaktionspuffer eingesetzt werden.

**Lösung S ersetzt nicht den Reaktionspuffer und sollte nur dann als weiterer Zusatz verwendet werden, wenn unspezifische Amplifikate auftreten.**

**Protokoll:** Als Standardpuffer werden die Reaktionspuffer A1 oder B2 empfohlen. Für weitere Optimierungen stehen die Puffer A2 und B1 zur Verfügung.

Die einzelnen Komponenten sollten in folgender Reihenfolge pipettiert werden: 10x Reaktionspuffer, evtl. zusätzlich Lösung S, H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, DNA-Template, Primer, Polymerase.

**Reaktionsmix:**

| Komponente                           | Volumen              | Endkonzentration           |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------------|
| 10x Reaktionspuffer                  | 10 µL                | 1x                         |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>              | 6 – 10 µL            | 1,5 – 2,5 mM               |
| 20 mM dNTP-Mix                       | 1 µL                 | 200 µM                     |
| Forward-Primer (10 pmol/µL)          | 1 – 3 µL             | 0,1 – 0,3 µM               |
| Reverse-Primer (10 pmol/µL)          | 1 – 3 µL             | 0,1 – 0,3 µM               |
| DNA-Template                         | 5 – 20 µL            | 5 – 100 ng/µL              |
| 10x Lösung S (falls erforderlich)    | 10, 20 oder 30 µL    | 1x, 2x oder 3x             |
| Hotstart-Taq-DNA-Polymerase (5 U/µL) | 0,4 – 1,0 µL         | 0,02 – 0,05 U/µL (2 – 5 U) |
| H <sub>2</sub> O (PCR grade)         | Auffüllen auf 100 µL |                            |
| Gesamt                               | 100 µL               |                            |

Um die Polymerase zu aktivieren, muß die PCR mit einem Inkubationsschritt bei 95 °C für 12 - 15 min gestartet werden. Die Annealingtemperatur sollte 2 – 6 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen. Die Elongationszeit sollte ca. 1 min/kb liegen.

**Empfohlenes PCR-Protokoll:**

| Schritt                | Temperatur | Zeit        | Zyklen  |
|------------------------|------------|-------------|---------|
| Initiale Denaturierung | 95 °C      | 12 – 15 min | 1       |
| Denaturierung          | 95 °C      | 30 – 60 s   | 26 - 35 |
| Annealing              | 50 – 68 °C | 30 – 60 s   |         |
| Elongation             | 72 °C      | 1 – 4 min   |         |
| Finale Elongation      | 72 °C      | 5 – 10 min  | 1       |

**Versand:** bei Umgebungstemperatur

**Lagerung:** bei - 20 °C

Lagerung bei Raumtemperatur für bis zu einem Monat hat keinen Einfluß auf die Qualität der Hotstart-Taq-DNA-Polymerase.

**Sicherheitshinweis:** Dieses Produkt sollte nur von Personen verwendet werden, die Routine in Laboranwendungen haben. Es sollte laborübliche Schutzkleidung wie Kittel, Handschuhe und Schutzbrillen getragen werden. Bei Kontakt mit Haut und Augen sollten die betroffenen Stellen umgehend mit Wasser gewaschen bzw. ausgespült werden.  
**Anwendungshinweis:** In bestimmten Ländern sind einige Anwendungen, für die dieses Produkt eingesetzt werden kann, patentrechtlich geschützt. Da durch den Kauf keine Lizenzen erworben werden, kann abhängig vom Anwendungsland und der Anwendung der Erwerb entsprechender Lizenzrechte erforderlich sein.