

Color Perpetual Taq DNA Polymerase

PCR PROTOCOL

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 ₂	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 Perpetual Taq DNA Polymerase, 1 U/µl	1.25 µl	1.25 U
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	<0.5 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Variabel	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

Hinweise:

- 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-fach Puffer), da solche Lösungen im gefrorenen Zustand Konzentrationsgradienten bilden.
- Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der Taq DNA Polymerase zunächst durch den monoklonalen Antikörper reversibel inhibiert wird.
- Ein Vorheizen des Thermocycler-Blocks auf 94-95°C vor Hineinstellen der PCR-Reaktionsansätze ist nicht notwendig.
- Bei Verwendung einer dNTP Konzentration von 0.2 mM je dNTP beträgt die Standard-Endkonzentration von MgCl₂ in PCR Reaktionen 1.5 mM (wie in Pol Puffer B bereitgestellt). In den meisten PCR Reaktionen werden mit dieser Konzentration zufriedenstellende Resultate erzielt. In einigen Fällen ist es jedoch notwendig, die optimale MgCl₂-Konzentration experimentell zu bestimmen. Für diesen Zweck ist Puffer A vorgesehen.
- Bei Verwendung von Color Perpetual 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.
- Die empfohlene Menge an Color Perpetual 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.
- Mindestens 0.75 U Color Perpetual Taq DNA Polymerase müssen je 50 µl Reaktionsvolumen eingesetzt werden, um das PCR Produkt direkt, ohne Ladepuffer, auf ein Agarosegel auftragen zu können.
- 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.

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm):

Schritt	Tempera-tur	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:

- Eine einleitende Denaturierung von 2 min Dauer ist zwingend notwendig, um den Antikörper zu denaturieren und die Aktivität der DNA Polymerase wieder herzustellen.
- 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.
- 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-armen) Sequenzabschnitte empfohlen, beispielsweise für einige Bereiche des *Arabidopsis*-Genoms.