



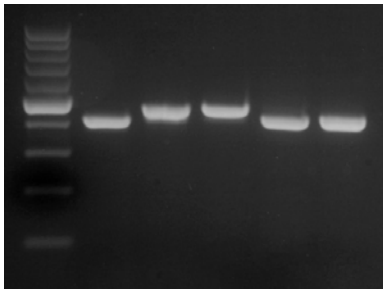
# Direct Plant PCR Kit

## Direct Plant PCR Kit

- für PCR Reaktionen aus Pflanzen -

Artikel Nr.	Größe
E0960-01	100 Reaktionen a 50 µl
E0960-02	500 Reaktionen a 50 µl

**Lagerbedingungen:**  
Lagerung bei -20°C

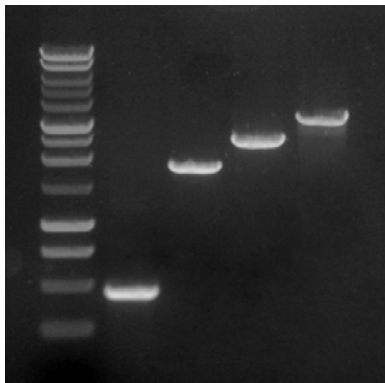


### PCR-Amplifikation aus verschiedenen Pflanzengeweben mittels des "Direct" Protokoll.

Konservierte Primer gegen ein ca. 400 bp langes, konserviertes DNA-Fragment aus pflanzlichen Chloroplasten.

Spur M: Marker: EURx Perfect Plus 1 kb Ladder (Best.Nr. E3131).

Spuren 1-5: Direkte Amplifikation aus (in der Reihenfolge von links nach rechts) Gras-Blätter, Petersilie-Blätter, Apfel-Samen, Gummibaum-Blätter und Fichten-Nadeln.



### Amplifikation mit dem EURx Direct Plant PCR Kit. Direkte PCR Amplifikation aus Petersilie-Blättern unter Verwendung des Extrakt-Protokolls.

Zur Amplifikation aus Chloroplasten-DNA wurden konservierte Primer verwendet. Spur M: Marker: EURx Perfect Plus 1 kb Ladder (Best.Nr. E3131).

Spuren 0,4 bis 4 kb: Direkte PCR Amplifikation aus Blättern von *Petroselinum crispum* unter Verwendung des "Extract"-Protokolls.

**Das Direct Plant PCR Kit ermöglicht direkte PCR-Reaktionen aus Pflanzenmaterial ohne vorherige DNA-Extraktion bzw. -Reinigung.**

#### Beschreibung:

- Direkte PCR Amplifikation aus Pflanzenmaterial wie z.B. Blätter, Samen sowie Pflanzenmaterial auf kommerziell erhältlichen Karten zur Probenahme und -lagerung.
- Sowohl für frisches als auch für gefrorenes Probenmaterial geeignet.
- Das Direct Plant PCR Kit ist ein "Hot Start" Kit. Es enthält eine thermostabile DNA Polymerase mit speziellen genetischen Anpassungen für hohe Toleranz gegen PCR-Inhibitoren aus Pflanzenmaterial.
- Das Enzym ist zunächst bei Raumtemperatur inaktiv. Die Aktivität der DNA Polymerase wird nach einem "Hot Start" während einer 10-minütigen initialen Denaturierung bei 95°C wieder hergestellt.
- Die Direct Plant DNA Polymerase katalysiert den Einbau von Nukleotiden zu Duplex-DNA in 5'-3' - Richtung.
- Das Enzym besitzt 3'-5' Proofreading Aktivität und erzielt damit eine um den Faktor 50 höhere Genauigkeit als Taq DNA Polymerase.
- 5'→3' Exonuklease-Aktivität ist nicht vorhanden. Bei Erreichen des 5'-Endes eines dsDNA Abschnittes während der Amplifikation hält das Enzym an.
- Das Enzym erzeugt stumpfe Enden (blunt).
- Eine erhöhte Polymerase-Prozessivität erlaubt kurze Extensionszeiten.
- **Die PCR-Bedingungen können, bedingt durch genetische Anpassungen des Enzyms, von Standard-PCR-Bedingungen abweichen. Das betrifft vor allem die Primerfixierungs-Temperatur (Annealing).**
- Zwei verschiedene Protokolle können durchgeführt werden: Das "Direkte" und das "Extrakt" - Protokoll.
- Der Master Mix enthält ein Farbstoffgemisch mit zwei Farbstoffen, die für direkte Gelbeladung verwendet werden können.
- Das Direct Plant PCR Kit ermöglicht die Amplifikation von Produkten mit mehr als 4 kb Länge.

#### Lagerungspuffer (Storage Buffer):

20 mM Tris-HCl (pH 9,0 bei 22°C), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 50 % [v/v] Glycerin und Stabilisatoren.

#### [2x] Plant PCR Master Mix:

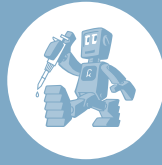
Der Master Mix enthält 2x konzentrierten, optimierten PCR-Puffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTPs und zwei Farbstoffe zur direkten Gelbeladung.

#### Das Direct Plant PCR Kit enthält:

1. 2 x Plant PCR Master Mix
2. Direct Plant DNA Polymerase
3. Extraktionspuffer ("Extraction Solution")
4. Verdünnungspuffer ("Dilution Solution")
5. Wasser, nukleasefrei

#### 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.



# Direct Plant PCR Kit

## PCR PROTOKOLL (1)

### Probenvorbereitung

Um kleine und gleichförmige Probenstücke zu erhalten, wird die Benutzung eines Skalpells oder eines Stanzers mit einem Lochdurchmesser von 0,3-0,5 mm empfohlen. Wenn der Stanzer bzw. das Skalpell wiederverwendet werden soll, müssen die Schneide- bzw. Stanzecken gereinigt werden, um Kreuzkontaminationen zwischen verschiedenen Proben zu verhindern. Zur Reinigung sollte eine 2% NaClO-Lösung verwendet werden.

### Wahl des Protokolles

Das Direct Plant PCR Kit enthält Reagenzien für zwei unterschiedliche Protokolle die Direkte und die Extrakt-Methode. Mit wenigen Ausnahmen sind beide Protokolle für alle Probenmaterialien geeignet.

Das Extrakt-Protokoll wird empfohlen für:

- erste Arbeiten mit neuem Probemateriali oder mit einem neuen Primer-Paar,
- bei schwierigen oder langen Amplikons (größer 1 kb),
- bei vielen parallelen Reaktionen aus derselben Probe.

Für das Extrakt-Protokoll können 20-50 µl Reaktionsvolumen verwendet werden. Das Direkt-Protokoll eignet sich nur für Reaktionsvolumina von 50 µl. Im Extraktionspuffer gelagertes Probenmaterial ist stabil und eignet sich als Ausgangsmaterial für PCR bei kurzfristiger Lagerung bis zu vier bis acht Wochen und +4°C oder bei langzeitiger Lagerung mit -20°C Lagertemperatur.

### Probenvorbereitung

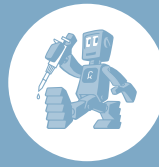
Eine Probe eines Durchmessers von ca. 0,35 bis 0,5 mm von Pflanzenblättern, Pflanzensamen oder von kommerziell erhältlichen Probekarten wird entnommen. Bei "schwierigem" Probenmaterial (etwa Gewebe mit einem hohen Anteil an Polyphenolen) kann ein kleineres Probenvolumen (0,35 mm) robustere Ergebnisse bringen.

Die Probe wird in eine PCR-Reaktion eines Gesamtvolumens von 50 µl überführt. Anschließend wird direkt eine PCR nach dem Protokoll auf der folgenden Seite durchgeführt.

### Probenvorbereitung

- Das Probenmaterial mit einem Durchmesser zwischen 0,35 – 1 mm wird in 50 µl Extraktionslösung überführt ("Extraction Solution").
- Die Probe wird für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- 50 µl Verdünnungslösung werden hinzugefügt ("Dilution Solution").
- Das Reaktionsgefäß wird kurz gemischt und anzentrifugiert, um unlösliche Reste der Gewebeproben abzutrennen.
- Der Überstand kann kurzfristig bei +4°C oder langfristig bei -20°C gelagert werden.

Sobald sich die Pflanzenproben im Mix aus Extraktions- und Verdünnungslösung befinden, können sie für bis zu 8 Wochen lagern, bevor sie in die PCR eingesetzt werden. Zur Langzeitaufbewahrung sollten die Proben bei -20°C gelagert werden. 1 µl des Überstandes wird in ein PCR-Volumen von 20 µl eingesetzt.



## Direct Plant PCR Kit PCR PROTOKOLL (2)

### Vorbereitung der PCR Reaktion mit Vollblut:

Komponente	Volumen je 20 µl Reaktion	Volumen je 50 µl Reaktion	Endkonzentration
2 x Plant PCR Master Mix	10 µl	25 µl	1x 2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
Primer A	Variabel	Variabel	0.5 µM
Primer B	Variabel	Variabel	0.5 µM
Plant DNA Polymerase	0.4 µl	1.0 µl	
Gewebeprobe Direktes Protokoll	-	Gewebeprobe 0,35-0,5 mm	
Extrakt- Protokoll	1 µl	2.5 µl	
H <sub>2</sub> O, DNA und DNase frei	Auf 20 µl	Auf 50 µl	
<b>Gesamtes Volumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>50 µl</b>	

### Hinweise:

- Puffer mischen:** 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.
- Ansatz bei Raumtemperatur:** Die Reaktionen können bei Raumtemperatur zusammengefügt werden. Es ist nicht erforderlich, den Zyklus (das PCR-Gerät) vorzuheizen. Die Reaktionen können bei Raumtemperatur in den Zyklus überführt werden.
- "Hot Start":** Die Proben können in einen PCR-Zyklus bei Raumtemperatur gestellt werden. Ein Vorheizen des Zyklus ist nicht erforderlich.
- Integrierter farbiger Ladepuffer:** Bei Verwendung des Direct Plant PCR Kits können PCR-Reaktionen ohne nachträglichen Zusatz eines Auftragspuffers auf ein Gel geladen werden. Dem Enzymmix sind zwei inerte Farbstoffe beige (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.
- Additiva und PCR-Optimierungen:** In der Regel ist eine Zugabe von Additiva zur PCR-Optimierung nicht erforderlich. Für einige, schwierig zu vervielfältigende PCR-Vorlagen können weitere Optimierungen notwendig werden. Das betrifft z.B. GC-reiche Sequenzabschnitte und Sequenzen mit komplexen Sekundärstrukturen. Zugabe von Additiven, beispielsweise DMSO (Startkonzentration, wenn benötigt: 3 % (v/v)) kann, vorlagenabhängig, die Amplifikation unterstützen.

### Reaktionsbedingungen (PCR-Programm):

Schritt	2-Schritt Protokoll		3-Schritt Protokoll		Anzahl der Zyklen
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98°C	10 min	98°C	10 min	1
Denaturierung	98°C	5-10 s	98°C	5-10 s	35-40
Annealing	-		X°C	15-30 s	
Extension	72°C	30 s / 1 kb	72°C	30 s / 1 kb	
Finale Extension	72°C	1 min	72°C	1 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	4°C	Unbegrenzt	1

### Hinweise:

- Zellysis:** Ein zehnjähriger einleitender Denaturierungsschritt bei 98°C bewirkt die Lysis von Zellen und aktiviert die "Hot Start" Plant DNA Polymerase.
- Primerbindung:** Plant DNA Polymerase stabilisiert die Hybridisierung zwischen Primer und DNA-Vorlage (template). Infolgedessen sind die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) und die optimalen Primerbindungstemperaturen (annealing) meist signifikant höher als die entsprechenden Temperaturen für Standard DNA Polymerasen. Die Schmelztemperaturen sollten nach der sog. base-stacking (bzw. nearest neighbor) Methode berechnet werden. Ein entsprechender Online-Rechner steht auf der Roboklon-Webseite bereit (<http://www.roboklon.de/eurx/bloodpcr>). Die Standard-Parameter sind: Primerkonzentration 500 nM, Salzkonzentration 50 mM, 1.5 mM Mg<sup>2+</sup> - Konzentration. Grundsätzlich gilt: Für Primer sollte eine Anlagerungs- (Annealing-) Temperatur bei der Schmelztemperatur des niedrigstschmelzenden Primers gewählt werden. Für Primer entspricht die Anlagerungstemperatur genau der Schmelztemperatur des niedrigstschmelzenden Primers. In einigen Fällen kann allerdings die optimale Anlagerungstemperatur von diesen Faustregeln abweichen. Hier muss die optimale Annealing-Temperatur empirisch bestimmt werden.
- Zweistufiges Protokoll:** Ein zweistufiges Protokoll erlaubt es, den Annealing- und Extensionsschritt bei einer Temperatur von 72°C zu kombinieren und somit den Zeitaufwand für eine PCR-Reaktion zu verkürzen. Zweistufige Protokolle empfehlen sich, wenn die  $T_m$  der Primer wenigstens 72°C beträgt.
- Extension:** Die empfohlene Extensionszeit beträgt 30 Sekunden je 1 kb Amplikon-Länge.