

Allgemeine PCR-Parameter

Hans-Joachim Müller, Daniel Ruben Prange

- 2.1 Reaktionsansätze – 10
- 2.2 Thermocycler-Profile – 10
- 2.3 PCR-Kontaminationen – 11
- 2.4 PCR-Kontrollen – 11
- 2.5 Allgemeines Troubleshooting – 11

Welche PCR-Parameter für ein optimales Ergebnis der entsprechenden PCR-Applikationen erforderlich sind, lässt sich schwer vorhersagen. Allerdings haben sich die unten beschriebenen Empfehlungen als Orientierung für den PCR-Start sehr gut bewährt.

2.1 Reaktionsansätze

Die Reagenzkonzentrationen lassen sich in den vorgeschlagenen Bandbreiten variieren. Wir empfehlen alle Pipettierschritte in der dargestellten Reihenfolge auf Eis durchzuführen, und das Enzym erst zum Schluss dem Reaktionsansatz beizumengen.

Die einzelnen Konzentrationen lassen sich mit folgender Formel einfach errechnen:

$$\frac{\text{Wunschkonzentration} \times \text{Wunschvolumen}}{\text{Stocklösung}} = \text{benötigtes Volumen aus der Stocklösung}$$

Beispiel: Es soll eine 800 µM Konzentration eines dNTP-Mixes in einem Reaktionsvolumen von 50 µl hergestellt werden. Die Stocklösung hat eine Konzentration von 40 mM (= 10 mM pro Nucleotid).

$$\frac{0,8 \text{ M dNTPs}}{40 \text{ mM dNTP}} \times 50 \mu\text{l} = 1,0 \mu\text{l aus der Stocklösung}$$

Die gleiche Rechnung wird im Laborjargon sehr häufig auch so ausgedrückt:

$$\frac{\text{Arzt}}{\text{Apotheke}} \times \text{Wunschmenge}$$

Der „Arzt“ bestimmt die Konzentration (z. B. 800 µM) eines Stoffes in einer 50 µl Lösung. Allerdings hat die „Apotheke“ als Stocklösung nur eine Konzentration von 40 mM.

■ Materialien

- Thermostabile DNA-Polymerase (1–5 u/µl)
- 10x Reaktionspuffer-Komplett (z. B. 200 mM Tris-HCl (pH 8,55), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂)

- Oligonucleotid A (50–100 pmol/µl)
- Oligonucleotid B (50–100 pmol/µl)
- dNTP-Mix (40 mM, 10 mM pro dNTP)
- Matrize (1,0–100 ng/µl)
- H₂O bidest.
- sterile Reaktionsgefäße (0,5 ml/0,2 ml) mit Sicherheitsverschluss

■ Durchführung

■ Pipettierschema für 50 µl Endvolumen

- add: 50 µl H₂O bidest.
- 5,0 µl: 10x Reaktionspuffer-Komplett
- xx¹ µl: Oligonucleotid A (Gesamtmenge 50–100 pmol)
- xx µl: Oligonucleotid B (Gesamtmenge 50–100 pmol)
- xx µl: Matrize (Gesamtmenge 0,1–100 ng)
- xx µl: dNTP-Mix (Endkonzentration 200–800 µM)
- xx µl: Thermostabile DNA-Polymerase (Gesamtmenge 0,5–2 u)

2.2 Thermocycler-Profile

Wenn Sie mit einer PCR beginnen und die optimalen PCR-Parameter noch nicht kennen, dann sind die unten aufgeführten Programmprofile eine gute Orientierung.

■ Material

- Thermocycler
- 50 µl Reaktionsansätze

■ Durchführung

■ Allgemeines PCR-Programm

- Schritt 1: 2 min/95 °C
- Schritt 2: 30 Sek/95 °C
- Schritt 3: 30 Sek/48–60 °C²
- Schritt 4: pro 1000 bp 1 min bei 68–75 °C
- 25–30 Zyklus: Schritt 2–4
- Schritt 5: 10 min bei 68–75 °C
- Schritt 6: ggf. runterkühlen auf 4 °C

1 xx beschreibt das erforderliche Volumen, welches in Abhängigkeit aller PCR-Komponenten variabel ist.

2 Diese Temperatur ist sehr stark von dem T_m-Wert der eingesetzten Oligonucleotide abhängig! Generell sollte die Annealing-Temperatur ca. 5 °C unter dem T_m-Wert liegen.

2.3 PCR-Kontaminationen

Die DNA-Polymerasen sind relativ robuste Enzyme, die geringe Verunreinigungen der Probe tolerieren und trotzdem eine effiziente PCR gewährleisten. Es lassen sich zum Beispiel „Colony-PCRs“ durchführen (► Kap. 15), bei denen der gesamte Zelldebris in der PCR-Lösung keinen negativen Effekt aufweist. Allerdings stellt die verbleibende genomische DNA eine große Kontaminationsquelle dar. Sofern sich die Oligonucleotide an diese kontaminierende DNA binden, kann es zu einer unspezifischen Amplifikation kommen, sodass unerwünschte Fragmente anstelle der erwarteten vervielfältigt werden. Diese Kontaminationsgefahr droht auch bei Verwendung häufig benutzter Lösungen und unsteriler Plastikmaterialien. Speziell für den diagnostischen Bereich muss auf strikte Sterilität geachtet werden, da selbst im Thermocycler befindliche „DNA-Kontaminationen“ das PCR-Ergebnis verfälschen können. Damit vormals amplifizierte DNA-Fragmente nicht durch Aerosole in das Reaktionsgefäß übertragen werden, empfiehlt es sich spezielle Filtertips sowie PCR-Reaktionsgefäße einzusetzen. Weiterhin lassen sich diese Verunreinigungen durch eine „UNG-PCR“ (► Kap. 8) vermeiden.

Sehr große Sorgfalt muss bei der RT-PCR gewahrt werden, da geringste Kontaminationen mit RNase die als Matrize dienende mRNA degradieren. Bei diesem Vorgang müssen besondere Lösungen und Arbeitsvorschriften beachtet werden, welche im ► Kap. 11 eingehend erklärt werden.

2.4 PCR-Kontrollen

Nichts ist schlimmer, als die Kontrolle der Kontrolle und dessen Kontrolle, ohne dass man zum gewünschten Ergebnis geführt wird. PCR-Kontrollen sind aber sehr wichtig und erleichtern die Analyse der Qualität ggf. auch der Quantität eines PCR-Produktes. Die einfachste Kontrolle ist eine „Positiv-Kontroll-PCR“, welche eine Aussage darüber erlaubt, ob alle PCR-Komponenten in der richtigen Konzentration eingesetzt worden sind, und ob der Thermocycler die einzelnen Zyklen moderat durchgeführt hat. Die einfachste Positiv-Kontrolle ist ein PCR-System (Matrize und Oligonucleotid), das bisher immer funktioniert hat. Erhält man hiermit ein Amplifikat,

in dem eigentlichen PCR-Ansatz aber nicht, dann lässt sich der Fehler auf die entsprechende Probe beschränken. Um nun herauszufinden, ob etwaige Hemmstoffe in der Matrizen-Suspension vorliegen, oder ob die Matrize degradiert wurde, kann man eine weitere einfache Kontrolle durchführen, indem die funktionierende Positiv-Kontrolle direkt in den zu untersuchenden Reaktionsansatz pipettiert und die PCR anschließend durchgeführt wird. Lässt sich danach kein Amplifikat der Positiv-Kontrolle nachweisen, sind Inhibitoren in der Matrizen-Suspension vorhanden. Diese müssen durch die üblichen Reinigungsmethoden entfernt werden.

Weitere PCR-Kontrollen stellen die sogenannten „Negativ-Kontrollen“ dar, bei denen entweder die Matrize oder eines der Oligonucleotide nicht zum Ansatz hinzugegeben werden. Mit diesem Verfahren erhält man einen Hinweis darauf, ob z. B. eine DNA-Kontamination vorliegt (ohne Matrize darf nichts amplifiziert werden!), oder ob einer der Oligonucleotide häufiger und gegenläufig an die Matrize binden kann.

2.5 Allgemeines Troubleshooting

Leider passiert es sehr oft, dass die gewünschten Resultate nach einer PCR nicht erhalten werden. Ausschlaggebend hierfür sind meist sehr kleine Abweichungen von den optimalen Bedingungen, die allerdings ebenso schnell wieder eliminiert werden können. Da aber sehr viele unterschiedliche PCR-Parameter zu berücksichtigen sind, ist es notwendig, dass für eine erfolgreiche Fehlersuche (Troubleshooting) bzw. PCR-Optimierung (► Kap. 20) jeweils nur einer dieser Parameter verändert wird. Nachfolgend sind verschiedene Möglichkeiten der Fehlersuche beschrieben, wobei für andere Kapitel sowie deren spezifische PCR-Anwendungen eine differente Troubleshooting-Strategie erforderlich sein kann.

■ Allgemeines Troubleshooting

Kein Amplifikat erhalten:

- Reduktion oder Erhöhung der Ausgangsmatrize in 5 ng Schritten.
- Systemüberprüfung, durch Durchführung einer Kontroll-PCR mit „funktionierenden“ PCR-Systemen.

- Überprüfen der korrekten Annealing-Temperatur.
- Hatte der Thermocycler einen Ausfall? Gegebenenfalls Thermocycler-Profil ausdrucken lassen.

Nach der Amplifikation wurde ein Bandenschmier festgestellt:

- Annealing-Temperatur in 1,0 °C-Schritten erhöhen.
- Dem PCR-Ansatz bis zu 10 % DMSO oder 5 % Formamid zusetzen.
- Weniger Matrize einsetzen.
- Überprüfen, ob die eingesetzten Oligonucleotide mehrmals an die Matrize binden, indem jeweils eines dieser Moleküle in der PCR eingesetzt wird.
- Sicherstellen, dass nach den PCR-Zyklen eine mindestens 10 minütige Extensionszeit abgeschlossen wurde.
- Reduktion oder Erhöhung der Ausgangsmatrize in 5 ng Schritten.
- Sicherstellen, dass nur sterile Lösungen und Reaktionsgefäße eingesetzt werden.
- Überprüfen, ob die Elongationszeit ausreichend für die PCR (ca. 1 min pro 1000 bp) ist.
- Erhöhen folgender Parameter/Konzentrationen: MnAc₂ bzw. MgCl₂ in 0,5 mM Schritten; PCR-Zyklen bis 35 Zyklen; Enzymkonzentration in 0,5 u Schritten; Oligonucleotidquantität in 5 pmol Schritten und RT-Temperatur in 2 °C Schritten.

PCR - Polymerase-Kettenreaktion

Müller, H.-J.; Prange, D.R.

2016, XV, 149 S. 39 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-662-48235-3