

Beispiel zur Erstellung eines Mastermixes für die PCR

Mit SuperHOTTAQ

Komponente	Volumen / 50µl PCR-Reaktion	Endkonzentration
10 x PCR-Puffer	5µl	1x
dNTP-Mix (40mM)	1µl	800 µM (200µM je dNTP)
Upstream Primer	variabel	0,1-0,5 µM
Downstream Primer	variabel	0,1-0,5 µM
SuperHOTTAQ 5u/µl	0,25µl-1,0µl	1,25-5,0 units
Template DNA	variabel	10 to 500ng /Reaktion
Steril dest. Wasser	Adjust to 50 µl Endvolumen	
Reaktionsvolumen	50 µl	

Die separate MgCl₂ Lösung 100 mM kann zur Bestimmung der optimalen MgCl₂-Konzentration für Ihre PCR in Kombination mit dem incomplete Puffer verwendet werden.

MgCl ₂ -Endkonz. in mM	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
Volume in µl of 100 mM MgCl ₂ pro 50 µl Reaktion	0,75	1,0	1,25	1,5	1,75	2,0	2,25	2,5	2,75	3,0

Standard Thermocycler-Protokoll:

2 min 94°C

10 sec 94°C

20 sec 55°C ist abhängig von der für Ihren Primer angegebenen Annealing-Temperatur (starten Sie für die Optimierung immer 0,5 °C unterhalb der angegebenen Temperatur)

1 min 30 sec 72°C
(30 cycles)

5 min 72°C

Anmerkungen:

Programmieren Sie Ihren Cycler gemäß den Angaben des Herstellers. Jedes Cycler-Programm sollte mit einem ersten Denaturierungsschritt bei 94 °C für 2 bis 5 min starten.

Wir empfehlen eine Elongationszeit von 1 min pro 1 Kb der Target-DNA.

Für eine maximale Ausbeute und Spezifität empfehlen wir die optimale Annealing-Temperatur und Zykluszeiten für jedes neue Primerpaar und Zielsequenz zu bestimmen.