

Information:

Der Schmelzpunkt der DNA ist diejenige Temperatur, bei der die Bindungskräfte (Wasserstoffbrückenbindungen) zwischen den beiden Einzelsträngen überwunden werden und diese sich von einander trennen. Diese Temperatur in Grad Celsius lässt sich für jeden Primer mit Hilfe der Wallace-Regel näherungsweise berechnen:

$$T_m = 2 * (A+T) + 4 * (G+C) [^{\circ}\text{C}]$$

Unter „primer annealing“ versteht man den Prozess der Anlagerung eines Primers an spezifische DNA-Sequenzen. Diejenige Temperatur, bei welcher sich die Bindungen zwischen einem Primer und der DNA-Vorlage ausbilden nennt man daher Annealingtemperatur.

Arbeitsaufträge:

1. Gegeben ist folgende Primersequenz: AAGTAGCTCATCGTTATGTGC
Berechnen Sie mit Hilfe der Wallace-Regel die Schmelztemperatur für einen vorliegenden Primer mit der gezeigten Sequenz.
2. Begründen Sie warum das Basenpaar G/C in der Wallace-Regel höher gewichtet wird als das Basenpaar A/T.
3. Begründen Sie warum man die optimale Annealingtemperatur ungefähr 2 °C unter der errechneten Schmelztemperatur wählen sollte.
4. In einigen Fällen kann die Wallace-Regel nur zur näherungsweisen Bestimmung der Annealingtemperatur eingesetzt werden. Dann kann es notwendig sein mit Hilfe einer sogenannten Gradienten-PCR die optimale Annealingtemperatur zu ermitteln. Bei dieser speziellen Art der PCR ist die Durchführung exakt identisch, nur werden unterschiedliche Annealingtemperaturen verwendet. Das unten abgebildete Elektropherogramm zeigt das Ergebnis einer solchen Gradienten-PCR.
 - a. Erläutern Sie die unterschiedlichen Ergebnisse bei 52 °C und 62 °C.
 - b. Welche Annealingtemperatur würden Sie wählen? Begründen Sie Ihre Antwort.
 - c. Ein Student soll die unten gezeigte PCR wiederholen und verwendet aus Versehen eine Annealingtemperatur von 72 °C und erhält kein PCR-Produkt. Erklären Sie das Ergebnis.

