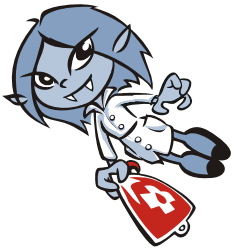
MANUFACTURED BY EURx

roboklon



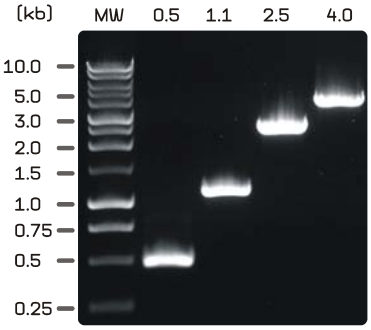
Direct Blood PCR Kit

Direct Blood PCR Kit

– für PCR Reaktionen aus Blut –

Artikel Nr.	Größe
E0950-01	100 Reaktionen a 20 µl
E0950-02	500 Reaktionen a 20 µl

Lagerbedingungen:
Lagerung bei -20°C



Amplifikation mit dem EURx Direct Blood PCR Kit.
Spur M: Marker: EURx Perfect Plus 1 kb Ladder (Best.Nr. E3131). Spuren 0.5 bis 4 kb: Direkte PCR Amplifikation aus menschlichem Blut (5 % [v/v] ohne vorherige DNA-Extraktion bzw. Reinigung.

Das Direct Blood PCR Kit enthält:

1. [2x] Blood PCR Master Mix
2. Blood DNA Polymerase
3. $MgCl_2$ [25 mM]
4. EDTA pH 8.0 [50 mM]
5. DMSO
6. Wasser, nukleasefrei

Das Direct Blood PCR Kit ermöglicht PCR-Reaktionen aus Vollblut ohne vorherige DNA-Extraktion bzw. Reinigung.

Beschreibung:

- Direkte PCR Amplifikation aus Blutproben. Geeignet für Vollblut (gelagert bei +4°C oder -20°C) oder getrocknete Blutproben z.B. auf Whatman FTA®-Karten.
- Auch für haltbar gemachte Blutproben mit Antikoagulanzien wie EDTA, Zitrat oder Heparin.
- Blut kann in einem breiten Konzentrationsbereich zwischen 1 % und 20 % [v/v] eingesetzt werden. Ein guter Anfangswert ist 5 % [v/v] (für diesen Wert ist die $MgCl_2$-Konzentration des PCR Puffers optimiert).
- Das Direct Blood PCR Kit enthält eine thermostabile DNA Polymerase mit speziellen genetischen Anpassungen für hohe Toleranz gegen PCR-Inhibitoren aus Blut.
- Die Blut 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 zehn Mal 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).**
- Das Direct Blood PCR Kit ermöglicht die Amplifikation von Produkten mit mehr als 4 kb Länge.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

20 mM Tris-HCl (pH 8.0 bei 22°C), 100 mM KCl, 0.5 % Tween™20, 0.5 % Igepal CA-630, 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 50 % [v/v] Glyzerin und Stabilisatoren.

[2x] Blood PCR Master Mix:

5 x Blood PCR Puffer:
Der Master Mix enthält 2x konzentrierten, optimierten PCR-Puffer, 6 mM $MgCl_2$ und dNTPs.

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.

ROBOKLON GMBH | ROBERT-RÖSSLE-STR.10 B55 | D-13125 BERLIN | GERMANY
FAX 030 / 310 19 19 7 | FON 030 / 318 09 37 2 | WWW.ROBOKLON.DE
HERGESTELLT VON EURx Sp. z o.o. POLAND | WWW.EURX.COM.PL | MADE IN THE EU
NUR FÜR DIAGNOSE, FORSCHUNG UND IN-VITRO ANWENDUNGEN

MANUFACTURED BY EURx

roboklon

Direct Blood PCR Kit

PCR PROTOKOLL (1)

Vorbereitung der PCR Reaktion mit Vollblut:

Komponente	Volumen je 20 µl Reaktion	Volumen je 50 µl Reaktion	Endkonzentration
2 x *Blood* PCR Puffer, enthält 6 mM $MgCl_2$.	10 µl	25 µl	1x 3,0 mM $MgCl_2$
Primer A	Variabel	Variabel	0.5 µM
Primer B	Variabel	Variabel	0.5 µM
Blood DNA Polymerase	0.4 µl	1.0 µl	
H_2O, DNA und DNase frei	Auf 19 µl	Auf 47.5 µl	
Prämix Volumen	**19 µl**	**47.5 µl**	
PCR-Prämix gründlich mischen. Kurz zentrifugieren. Blut auf den Boden des PCR-Gefäßes pipettieren. Blut ist schwerer als der PCR-Prämix und verbleibt am Boden. Blut und PCR-Prämix nicht vermischen!			
Vollblut	1 µl	2,5 µl	5 % [v/v]
Gesamt-volumen	20 µl	50 µl	-

Vorbereitung der PCR Reaktion mit getrocknetem Blut (Blutkarten):

Einen 1-2 mM großer Ausstanzer in ein PCR-Gefäß geben und mit 100 µl sterilem Wasser durch Auf- und Abpipettieren gwaschen. Das Wasser vollständig abziehen und verwerfen. PCR-Prämix in separatem Gefäß vorbereiten.			
Komponente	**Volumen je 20 µl Reaktion**	**Volumen je 50 µl Reaktion**	**Endkonzentration**
5 x *Blood* PCR Puffer, enthält 15 mM $MgCl_2$.	10 µl	25 µl	1x 3,0 mM $MgCl_2$
Primer A	Variabel	Variabel	0.5 µM
Primer B	Variabel	Variabel	0.5 µM
Blood DNA Polymerase	0.4 µl	1.0 µl	
H_2O, DNA und DNase frei	Auf 20 µl	Auf 50 µl	
Prämix Volumen	**20 µl**	**50 µl**	
PCR-Prämix gründlich mischen. Kurz zentrifugieren. PCR-Prämix zu dem gewaschenen Ausstanzer geben. Nicht mischen. Kurz zentrifugieren.			
Ausstanzer (1-2 mM Größe)			
Gesamt-volumen	20 µl	50 µl	-

Optionale Komponenten der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je 20 µl Reaktion	Volumen je 50 µl Reaktion	Endkonzentration
25 mM $MgCl_2$	0,4-1.2 µl	1-3 µl	3,5-4,5 mM
50 mM EDTA	0,4-0.8 µl	1-2 µl	1,0-2,0 mM
DMSO	0,4-0.8 µl	1-2 µl	2-4 % [v/v]

Hinweise:

1. **Lagerung:** Blut kann bei +4°C für bis zu drei Monate gelagert werden. Für langfristige Aufbewahrung wird eine Lagertemperatur von -20°C oder alternativ eine getrocknete Lagerung z.B. auf Whatman FTA® Karten empfohlen. Blut kann mit EDTA, Zitrat und Heparin haltbar gemacht werden.
2. **Blutkonzentration:** Blut kann in Endkonzentrationen von 1 % bis 20 % [v/v] in PCR Reaktionen mit dem Direct Blood PCR Kit eingesetzt werden. Die empfohlene Anfangskonzentration ist 5 % [v/v] - für diesen Wert ist die $MgCl_2$ Konzentration des PCR Puffers optimiert.
3. **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.
4. **Auf Eis:** Für beste Resultate die Reaktionsansätze **auf Eis** pipettieren.
5. **PCR-Reaktionen aus Vollblut:** Zunächst sollte ein PCR-Prämix angesetzt werden, allerdings ohne Blut. Die Blood DNA Polymerase sollte man stets als letzte Komponente zum PCR-Prämix zugefügen, da die Proofreading-Aktivität der Polymerase in Abwesenheit von dNTPs Primer angreift und abbaut. Der PCR-Prämix sollte gut gemischt werden. Die Reaktionsansätze werden kurz anzentrifugiert, um die Flüssigkeit zu sammeln und Blasen zu entfernen. Das Blut soll auf den Boden des Reaktionsgefäß pipettiert und nicht mit dem PCR-Prämix gemischt werden.
6. **PCR-Reaktionen aus getrocknetem Blut (Karten):** Ein 1-2 mM großer Ausstanzer wird in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben und mit 100 µl sterilem, DNA-freiem Wasser durch 4- 6-maliges Auf- und Abpipettieren gewaschen. Das Wasser wird vollständig abgezogen und verworfen. In einem separaten Gefäß wird ein PCR-Prämix mit allen Komponenten (außer dem Ausstanzer) angesetzt. Die Blood DNA Polymerase sollte man stets als letzte Komponente zum PCR-Prämix zugefügen, da die Proofreading-Aktivität der Polymerase in Abwesenheit von dNTPs Primer angreift und abbaut. Der PCR-Prämix sollte gut gemischt werden. Die Reaktionsansätze werden kurz anzentrifugiert, um die Flüssigkeit zu sammeln und Blasen zu entfernen. Der Ausstanzer wird mit dem PCR-Prämix überschichtet und sollte nicht mit dem PCR-Prämix gemischt werden. Kurz anzentrifugieren.
7. **Cycler vorheizen:** Reaktionen in einen auf 94-95°C vorgeheizten Cycler stellen.
8. **$MgCl_2$:**Mit dem Blut PCR Puffer wird eine finale Reaktionskonzentration von 3 mM $MgCl_2$ bereitgestellt. In den meisten Fällen werden mit dieser Konzentration für 5 % [v/v] Blut gute Ergebnisse erzielt, manchmal sogar für 10 % [v/v] Blut. Blutkonzentrationen höher als 10 % benötigen höhere Mg^{2+}-Konzentrationen. Hier sollte die beiliegende 25 mM $MgCl_2$ - Stammlösung verwendet werden, um die $MgCl_2$ - Konzentration auf bis zu 4.5 mM anzuheben. 1 µl einer 25 mM $MgCl_2$ Lösung enthält 25 nmol $MgCl_2$ und erhöht die finale Reaktionskonzentration um 0.5 mM (50 µl) bzw. 1.25 mM (20 µl).
9. **EDTA:** Zu hoher $MgCl_2$-Gehalt in der Reaktion führt zur Bildung unspezifischer Produkte. In solchen Fällen kann man die effektiv wirksame $MgCl_2$-Konzentration vermindern durch Zugabe von 1 bis 2 µl einer 50 mM EDTA-Lösung (im Kit enthalten) je 50 µl Reaktion. Das kann notwendig werden, falls weniger als 5 % [v/v] Blut in die Reaktion eingesetzt wird.
10. **Polymerase-Konzentration:** Für 50 µl Reaktionen ist 1 µl Blood DNA Polymerase die empfohlene Menge. Gelegentlich ist weitere Optimierung erforderlich. Wenn unspezifische Banden auftreten, sollte die Enzymmenge reduziert werden, z.B. auf 0.75 µl je 50 µl Reaktion.
11. **PCR-Optimierungen:** Für einige, schwierig zu vervielfältigende PCR-Vorlagen können weitere Optimierungen notwendig werden. Das betrifft z.B. GC-reiche Sequenzabschnitte, Sequenzen mit komplexen Sekundärstrukturen. Zugabe von Additiven, beispielsweise DMSO (Startkonzentration, wenn benötigt: 2 % [v/v]) kann, vorlagenabhängig, die Amplifikation unterstützen.
12. **Im Anschluss an die PCR werden die Reaktionen für 1 min bei höchster Umdrehungszahl zentrifugiert, um Bluttrümmer zu pelletieren.**

ROBOKLON GMBH | ROBERT-RÖSSLE-STR.10 B55 | D-13125 BERLIN | GERMANY
FAX 030 / 310 19 19 7 | FON 030 / 318 09 37 2 | WWW.ROBOKLON.DE
HERGESTELLT VON EURx Sp. z o.o. POLAND | WWW.EURX.COM.PL | MADE IN THE EU
NUR FÜR DIAGNOSE, FORSCHUNG UND IN-VITRO ANWENDUNGEN

Direct Blood PCR Kit

PCR PROTOKOLL (2)

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm):

Schritt	2-Schritt Protokoll		3-Schritt Protokoll		Anzahl der Zklen
	Tempe-ratur	Zeit	Tempe-ratur	Zeit	
Initiale De-naturierung	98˚C	5 min	98˚C	5 min	1
Denaturie-rung Annealing Extension	98˚C - 72˚C	5-10 s 30 s / 1 kb	98˚C X˚C 72˚C	5-10 s 10-30 s 30 s / 1 kb	35-40
Finale Ex-tension	72˚C	1 min	72˚C	1 min	1
Kühlschritt	4˚C	Unbe-grenzt	4˚C	Unbe-grenzt	1

Hinweise:

1. **Leukozyten-Lysis:** Ein fünfminütiger einleitender Denaturierungsschritt bei 98˚C bewirkt die Lysis von Leukozyten.
2. **Primerbindung:** Blood DNA Polymerase stabilisiert die Hybridisierung zwischen Primer und DNA-Vorlage (template). Infolgedessen sind die Schmelztemperaturen (Tm) 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^{2+} - Konzentration. Grundsätzlich gilt: Für Primer mit weniger als 20 nt Länge sollte eine Anlagerungs- (Annealing-) Temperatur von 3˚C oberhalb der Schmelztemperatur des niedrigstschmelzenden Primers gewählt werden. Für Primer einer Länge von exakt 20 nt 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.
3. **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 70˚C beträgt.
4. **Extension:** Die empfohlene Extensionszeit beträgt 30 Sekunden je 1 kb Amplikon-Länge.

Fehlerdiagnose:

Unspezifische Produkte

- → Erhöhung der Primerbindungstemperatur ("annealing").
- → Zufügen von 50 mM EDTA (1-2 µl je Reaktion).
- → Erniedrigung der Menge an Blood DNA Polymerase je Reaktion.
- → Verkürzung der Extensionszeit.
- → Erhöhung des Volumenanteils an Blut je Reaktion.
- → Design neuer Primer.