

FAST SG qPCR Master Mix (2x) + ROX REAL TIME PCR KIT



Kit Components:

Fast SG qPCR Master Mix (2x) plus ROX Solution

Component	Cat. No. E0412-01	Cat. No. E0412-02	Cat. No. E0412-03
	100 reactions, 25 µl each, 2.5 ml (1x) final volume	200 reactions, 25 µl each, 5 ml (1x) final volume	1.000 reactions, 25 µl each, 25 ml (1x) final volume
Fast SG qPCR Master Mix (2x)	1 x 1.25 ml	2 x 1.25 ml	10 x 1.25 ml
ROX Solution, 25 µM	20 µl	35 µl	130 µl
UNG (uracil-N- glycosylase) 1 U/µl	30 µl	55 µl	270 µl
Water, nuclease free	1 x 1.25 ml	2 x 1.25 ml	10 x 1.25 ml

Storage

Store at 4°C in the dark. The performance of the master mix is guaranteed up to 9 months. Freezing and thawing of the master mix should be avoided.

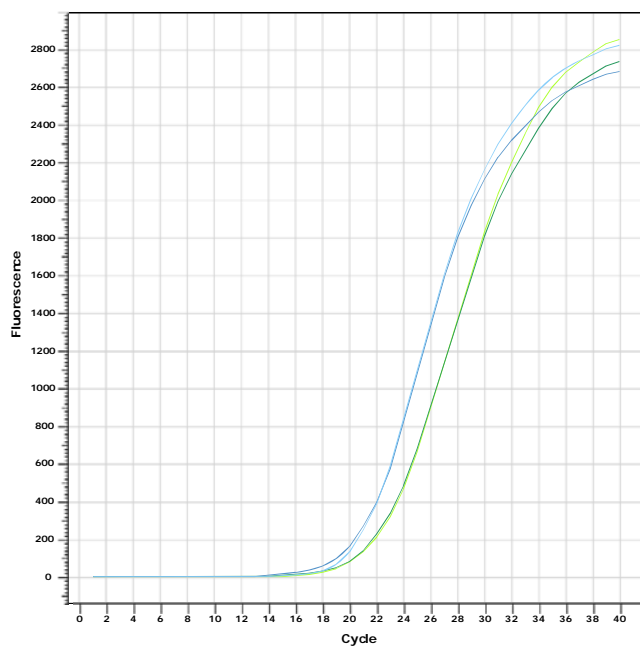
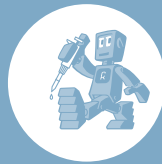


Figure 1: FAST SG qPCR Master Mix (blue colored curves) and "standard" SG qPCR Master Mix (green colored curves) differ by -1 Ct.
PCR conditions: 45°C 120s (UNG step) - 95°C 180 s - 45 x (96°C 5 s, 64°C 10 s, 72°C 20 s).
Ct values: Fast SG qPCR Master Mix 20.41 and 20.65, respectively, "standard" SG qPCR Master Mix: 21.73 and 21.89, respectively.

Description:

- Optimized fast qPCR master mix for 2-step and 3-step qPCR protocols.
- Fast SG qPCR Master Mix (2x) is a universal solution for quantitative real-time PCR and two-step real-time RT-PCR and is compatible with most real-time PCR cyclers available.
- The master mix contains Perpetual *Taq* DNA Polymerase, optimized reaction buffer, dNTPs (dTTP is partially replaced with dUTP) and SYBR Green I dye.
- Perpetual *Taq* DNA Polymerase contains a recombinant *Taq* DNA Polymerase bound to anti-*Taq* monoclonal antibodies that block polymerase activity at moderate temperatures.
- The polymerase activity is restored during the initial denaturation step, when amplification reactions are heated at 95°C for at least two minutes.
- Use of the "hot start" enzyme prevents extension of misprimed products and primer-dimers during reaction setup leading to higher specificity and sensitivity of PCR reactions.
- The polymerase - antibody enzyme preparation enables convenient reaction setup at room temperature.
- SYBR Green I enables DNA analysis without synthesizing expensive sequence-specific labeled probes.
- SYBR Green I is a fluorescent dye which binds all double-stranded DNA molecules and emits a fluorescent signal on binding. The excitation and emission maxima of SYBR Green I are at 494 nm and 521 nm, respectively, which are compatible with use on any real-time cycler.
- Fast SG qPCR Master Mix (2x) contains dUTP, which partially replaces dTTP. It allows the optional use of an uracil-N-glycosylase (UNG) to prevent carryover contamination between reactions. UNG removes uracil from any dU-containing contaminating amplicons, leaving abasic sites and making DNA molecules susceptible to hydrolysis during the initial denaturation step. Any introduced dUTP labelled DNA (such as dUTP labelled PCR amplicons, which may eventually accumulate in laboratories over time due to aerosol formation) is efficiently removed, while template DNA without U-residues remains unaffected by UNG treatment.
- There are two variants of the kit: without ROX and with ROX Solution provided separately. The use of ROX passive reference dye is necessary for all real-time PCR cyclers from Stratagene. ROX compensates for variations of fluorescent signal between wells due to slight differences in reaction volume and fluorescence fluctuations. ROX is not involved in PCR reaction, has a different emission spectrum than SYBR Green I and does not interfere with real-time PCR on any instrument. Refer to the table below to determine the recommended amount of ROX (25 µM) required for a specific PCR cycler.



Fast SG qPCR Master Mix (2x)

REAL TIME PCR PROTOKOLL

qPCR- Protokoll

Für bestimmte Echtzeit-PCR-Geräte benötigte ROX-Volumina:

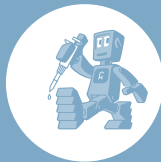
Instrument	Benötigte ROX-Menge je 25 µl Reaktion	Benötigte ROX-Menge je 25 µl Reaktion	Endgültige ROX-Konzentration
Applied Biosystems: 7300, 7900HT, StepOne, StepOnePlus, ABI PRISM 7000 und 7700	0,1 µl	10 µl	100 nM
Applied Biosystems: 7500, ViiA 7 Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0,1 µl 10 x verdünnt (in Wasser)	10 µl 10 x verdünnt (in Wasser)	10 nM
Weitere Echtzeit-PCR-Geräte: Bio-Rad, Roche, Corbett, Eppendorf, Cepheid, etc.	Nicht benötigt	Nicht benötigt	-

Ansetzen der qPCR Reaktion:

Komponente	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
Fast SG qPCR Master Mix (2x)	12.5 µl	1 x 2 mM MgCl ₂
5'-Primer	Variabel	0.5 µM
3'-Primer	Variabel	0.5 µM
Vorlagen-DNA	Variabel	< 500 ng
Optional: ROX Lösung, 25 µM	0,1 µl oder 0,1 µl 10 x verdünnt	100 nM 10 nM
Optional: UNG (Uracil-N-Glycosylase) 1 U/µl	0.25 µl	0.25 U / Reaktion
Wasser, nukleasefrei	Auf 25 µl	-
Endvolumen	25 µl	-

Hinweise:

- Dunkel lagern.** Fast SG qPCR Master Mix (2x) und ROX Lösung sollten vor Lichteinfluss geschützt werden um einem vorzeitigen Verlust der Fluoreszenz-Signalintensität entgegenzuwirken.
- Reaktionsvolumen 25 µl.** Das empfohlene Reaktionsvolumen für die meisten Echtzeit-PCR-Geräte beträgt 25 µl. Andere Volumina können verwendet werden, wenn für ein spezifisches Gerät empfohlen.
- Optimale Länge des Amplikons.** Die optimale Amplikonlänge für Echtzeit-PCR mit SYBR Green I beträgt 70 - 200 bp.
- Konzentrationsunterschiede vermeiden:** Vor Gebrauch alle Lösungen auftauen, schonend vortexen und kurz zentrifugieren.
- Arbeiten bei Raumtemperatur:** PCR-Reaktionen werden mit dem Fast SG qPCR Master Mix (2x) komfortabel bei Raumtemperatur angesetzt.
- Reaktions-Mastermix:** Bei hohem Probendurchsatz kann ein Reaktions-Master Mix vorbereitet werden, der alle Komponenten bis auf Vorlagen-DNA (Template) enthält.
- Proben mischen:** Der Reaktions-Master Mix wird gründlich gemischt und geeignete Aliquots werden in PCR-Reaktionsgefäße oder -platten verteilt.
- Menge an Vorlagen-DNA.** Vorlagen-DNA bzw. cDNA (< 500 ng / Reaktion) wird zum Reaktions-Master Mix in die einzelnen Gefäße bzw. Platten verteilt. Für zweistufige RT-PCR sollte der Anteil der cDNA Lösung am gesamten Reaktionsvolumen nicht mehr als 10% des PCR-Endvolumens betragen.
- Kurz zentrifugieren,** um die Reaktionskomponenten am Gefäßboden zu sammeln und Luftblasen zu entfernen. Luftblasen beeinträchtigen die quantitative Fluoreszenzmessung empfindlich.
- Start.** Die Proben werden in das Echtzeit-PCR-Gerät gestellt und das Programm zur Fluoreszenzmessung gestartet.
- MgCl₂:** Die Standardkonzentration von MgCl₂ in Echtzeit-PCR-Reaktionen ist 2 mM (wie in 1 x Fast SG qPCR Master Mix enthalten) - für die meisten PCR Reaktionen optimal. Wenn höhere MgCl₂ Konzentrationen benötigt werden, sollte eine 25 mM MgCl₂ Stammlösung hergestellt werden (kann bei Bestellung bei uns angefordert werden). 1 µl einer 25 mM MgCl₂-Lösung fügt 25 nmol zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die MgCl₂-Konzentration einer 25 µl Reaktion um 1.0 mM.
- Die empfohlene Anfangskonzentration je Primer** beträgt 0.5 µM. Wird die Primerkonzentration erhöht, kann die PCR-Effizienz steigen, aber die Spezifität der PCR-Reaktion nimmt ab. Die optimale Primerkonzentration hängt sowohl von der einzelnen Reaktion als auch vom verwendeten Echtzeit-PCR-Gerät ab. Bei Ausbildung unspezifischer PCR-Produkte sollte die Primerkonzentration auf 0.3 µM herabgesetzt werden.
- Einstellen des Schwellenwertes:** Der Schwellenwert (threshold value) für die Analyse soll vor jeder Messung eingestellt werden.
- Gefäß-Korrekturfaktor bestimmen.** Wird eines der Instrumente, Bio-Rad iCycler iQ oder MyiQ, eingesetzt, sollte am Anfang der Messung ein Gefäß-Korrekturfaktor ("well factor") bestimmt werden. Gefäßfaktoren dienen zur Korrektur für Variationen bei Fluoreszenzanregung oder zur Korrektur von Pipettierungenauigkeiten. Zur Bestimmung wird eine spezielle, externe "well factor" - Platte gemäß der Empfehlungen des Herstellers eingesetzt.



Fast SG qPCR Master Mix (2x)

REALTIME PCR PROTOKOLL

qPCR- Protokoll - Echtzeit-PCR-Bedingungen

Programm für das Echtzeit-PCR-Gerät:

2-stufiges Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Optional: UNG- Vorbehandlung	50°C	2 min	1
Einleitende De- naturatierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	10 s	35-45
Primer-Bindung	60°C	30 s	
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

3-stufiges Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Optional: UNG- Vorbehandlung	50°C	2 min	1
Einleitende De- naturatierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	10 s	35-45
Primer-Bindung	50-65°C	10 s	
Verlängerung	72°C	15 s	
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

Hinweise:

- 2-stufiges Protokoll für schnelle qPCR:** Fast SG qPCR Master Mix wurde für die Verwendung mit einem 2-stufigen PCR-Protokoll entwickelt und optimiert. Dieses Protokoll eignet sich für die Verwendung mit den meisten Primern, auch wenn der nominale T_m deutlich unterhalb 60°C liegt.
- Einleitender Uracil-Glycosylase-Inkubationsschritt:** Wird Uracil-N-Glycosylase (UNG) optional eingesetzt, muss ein Inkubationsschritt bei 50°C für zwei Minuten durchgeführt werden. UNG baut dUMP-enthaltende, kontaminierende PCR-Produkte ab und wirkt somit Verschleppungskontaminationen entgegen.
- Einleitende Denaturierung:** Während des einleitenden Denaturierungsschrittes werden sowohl UNG als auch *Taq*-blockierende anti *Taq*-Antikörper inaktiviert. Zur vollständigen Denaturierung werden die Reaktionen für 2 - 10 min bei 95°C inkubiert. Die einleitende Denaturierung kann auf 2 - 5 min bei 95°C verkürzt werden, wenn UNG nicht in den Reaktionsansätzen enthalten ist.
- Partielle UNG-Protein-Rückfaltung:** Bei Temperaturen unterhalb von 55°C wird UNG-Aktivität teilweise wieder hergestellt, da sich das Protein erneut zurück faltet. Deswegen sollte die Temperatur bei allen PCR-Schritten 55°C nie unterschreiten, insbesondere bei der Primer-Bindung (dem "Annealing"). Unmittelbar nach Beendigung der PCR sollten die Reaktionen auf 4°C gekühlt werden und anschließend entweder direkt auf ein Gel aufgetragen oder in gefrorenem Zustand gelagert werden.
- Qualitätskontrolle - Schmelzkurvenanalyse:** Die Schmelzkurve sollte analysiert werden, um Spezifität und Identität des PCR-Produktes zu verifizieren. Entsprechende, leistungsfähige Routinen zur Schmelzkurvenanalyse sind Bestandteile der Programmausrüstung gängiger Echtzeit-PCR-Geräte. Als Grundlage sollten die Daten für einen Temperaturbereich zwischen 65°C und 95°C herangezogen werden.
- Qualitätskontrolle - Agarose-Gelelektrophorese:** Während der Entwicklung eines neuen PCR-Tests sollte die Spezifität des PCR-Produktes immer parallel durch Gelelektrophorese überprüft werden, da sich die Schmelzkurven von spezifischen und unerwünschten, unspezifischen Produkten (v.a. Primer-Dimere) überlappen können.