



SG 1-Step RT-qPCR Master Mix + ROX

ONE STEP REAL TIME RT-PCR KIT



Beschreibung:

Der Kit besteht aus:

- dem *Master Enzyme Mix* mit einer speziell optimierten Reversen Transkriptase, einer "HotStart" DNA Polymerase (inhibiert durch einen hochaffinen, monoklonalen Antikörper), RNase Inhibitor sowie SYBR Green I Farbstoff;
- dem *qRT-PCR Master Buffer (2x)*, einem optimierten, universell anwendbaren Reaktionspuffer mit dNTPs (dTTP ist teilweise durch dUTP ersetzt). Der Puffer ist kompatibel zu den meisten, gebräuchlichen RealTime PCR Geräten,
- einer *thermolabilen Uracil-N-Glycosylase* (wird in einem separatem Reaktionsgefäß bereitgestellt, optional einsetzbare Komponente),
- *nukleasefreiem Wasser*.

Kit-Komponenten:

SG 1-Step RT-qPCR Master Mix (2x)

Komponente	Artikel Nr. E0810-01	Artikel Nr. E0810-02
	25 Reaktionen, je 25 µl, 625 µl [1x] Endvolumen	100 Reaktionen, je 25 µl, 2,5 ml [1x] Endvolumen
SG 1-Step RT-qPCR Master Enzyme Mix	25 µl	100 µl
qRT-PCR Master Buffer (2x)	1 x 350 µl	2 x 0.7 ml
Thermolabile UNG (Uracil-N-Glycosylase) 1 U/µl	10 µl	30 µl
Wasser, nukleasefrei	1 x 0.5 ml	2 x 1 ml

SG 1-Step RT-qPCR Master Mix (2x) plus ROX Solution

Komponente	Artikel Nr. E0811-01	Artikel Nr. E0811-02
	25 Reaktionen, je 25 µl, 625 µl [1x] Endvolumen	100 Reaktionen, je 25 µl, 2,5 ml [1x] Endvolumen
SG 1-Step RT-qPCR Master Enzyme Mix	25 µl	100 µl
ROX Lösung, 25 µM	25 µl	100 µl
qRT-PCR Master Buffer (2x)	1 x 350 µl	2 x 0.7 ml
Thermolabile UNG (Uracil-N-Glycosylase) 1 U/µl	10 µl	30 µl
Wasser, nukleasefrei	1 x 0.5 ml	2 x 1 ml

Lagerung:

Lagerung bei -20°C im Dunklen.

Der SG 1-Step qRT-PCR Kit ermöglicht präzise und sensitive qPCR-Quantifizierungen in einstufigen, schnellen und einfach durchzuführenden Analysen. Ausgehend von RNA wird RT-qPCR in einem einzigen Schritt durchgeführt. Das Kit besteht aus einer speziellen, gezielt auf qPCR optimierten reversen Transkriptase und aus hochreiner, prozessiver Perpetual Taq DNA Polymerase ("Hot Start" mittels monoklonalem Antikörper).

Eigenschaften:

- Die Reverse Transkriptase arbeitet in einem breiten Temperaturspektrum zwischen 25°C und 55°C. Sie eignet sich damit hervorragend zur reversen Transkription auch von RNA mit Abschnitten starker Sekundärstrukturen, ohne an Spezifität und Sensitivität einzubüßen.
- cDNA Synthese und die anschließende PCR-Amplifikation werden in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt, unter Verwendung genspezifischer Primer und wahlweise entweder totaler RNA oder isolierter mRNA.
- Perpetual Taq DNA Polymerase ist eine "HotStart" DNA Polymerase und besteht aus rekombinant hergestellter Taq DNA Polymerase, reversibel komplexiert mit einem sorgfältig aufgereinigten monoklonalen Antikörper. Der präzise "HotStart" ist wichtig, damit sich vor der ersten Denaturierung keine unerwünschten, ergebnisverfälschenden Produkte ausbilden können. Hierzu gehören insbesondere Primer-Dimere, Produkte von Primerextensionen, verursacht durch unspezifische Primer-Primer-Bindung (Annealing) bei Temperaturen kleiner als 50°C. Die Replikationsaktivität der Taq DNA Polymerase ist durch den inhibitorischen Antikörper blockiert, mindestens bis zum Erreichen von ausreichend hohen Temperaturen, die solche Primer-Primer-Wechselwirkungen thermisch verhindern. Während des initialen Denaturierungsschrittes ändert der Antikörper seine Sekundär- und Tertiärstruktur und verliert damit irreversibel seine inhibitorische Wirkung. Der monoklonale Antikörper zeichnet sich durch besonders hohe Spezifität aus. Deshalb wird nur ein einzelner monoklonaler Antikörper mit präzise definierten Denaturierungseigenschaften verwendet, also kein Gemisch verschiedener Antikörper mit jeweils verminderter Spezifität und insgesamt unscharfen Verhalten im Hinblick auf thermische Denaturierung.
- Die Polymeraseaktivität wird durch irreversible Denaturierung des Antikörpers während des einleitenden Denaturierungsschrittes (3 min bei 95°C) wieder hergestellt.
- SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit Spezifität gegenüber doppelsträngiger DNA (dsDNA). Nach Bindung in dsDNA und Anregung durch Licht einer Wellenlänge von 494 nm ("excitation") wird Licht einer Wellenlänge von 521 nm emittiert. Das Lichtsignal der Wellenlänge von 521 nm kann auf allen marktüblichen RealTime Geräten detektiert werden und ist zu diesen kompatibel.
- Das Kit enthält eine thermolabile Uracil-N-Glycosylase (UNG), die in einem separaten Reaktionsgefäß geliefert wird und optional zum Kontaminationsschutz eingesetzt werden kann.
- Wenn qPCR Apparate von der Fa. Applied Biosystems eingesetzt werden, muss der passive Referenzfarbstoff ROX zwingend verwendet werden. Für manche Geräte der Fa. Stratagene kann ROX optional eingesetzt werden. Der SG 1-Step RT-qPCR Master Mix ist, je nach Bedarf, in zwei Varianten erhältlich, (1) ohne ROX und (2) mit ROX in einem separaten Reaktionsgefäß. Die unten aufgeführte Tabelle zeigt die empfohlenen Mengen an ROX für verschiedene qPCR Apparate.



SG 1-Step RT-qPCR Master Mix

REAL TIME qPCR PROTOKOLL

qPCR- Protokoll

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

Instrument	Benötigte ROX-Menge je 25 µl Reaktion	Endgültige ROX-Konzentration
Applied Biosystems: 7300, 7900HT, StepOne, StepOnePlus, ABI PRISM 7000 und 7700	0.3-0.5 µl	300-500 nM
Applied Biosystems: 7500 Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0.3-0.5 µl 10 x verdünnt (in Wasser)	30-50 nM
Weitere Echtzeit-PCR-Geräte: Bio-Rad, Roche, Corbett, Eppendorf, Cepheid, etc.	Nicht benötigt	-

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
qRT-PCR Master Buffer (2x)	12.5 µl	1 x
5'-Primer (Vorwärts)	Variabel	0.3 - 0.5 µM
3'-Primer (Revers)	Variabel	0.3 - 0.5 µM
Optional: ROX Lösung, 25 µM	0.3-0.5 µl oder 0.3-0.5 µl 10 x verdünnt	300-500 nM 30-50 nM
Optional: Thermostabile UNG (Uracil-N-Glycosylase) 1 U/µl	0.25 µl	0.25 U / Reaktion
Master Enzyme Mix (als letzte Komponente zum Reaktions-Mastermix zufügen)	1 µl	1 µl pro Reaktion
Vorlagen-RNA	Variabel	500 ng
Wasser, nukleasefrei	Auf 25 µl	-
Endvolumen	25 µl	-

Hinweise zur Durchführung des qPCR Protokolls:

- Dunkel lagern.** SG 1-Step RT-qPCR Master Mix sowie ROX sollten vor Lichteinfluss geschützt werden, um einer vorzeitigen Einbuße der Signalintensität entgegenzuwirken.
- Minimierung der Gefrier-Auftau-Zyklen.** Die Anzahl an Gefrier-Auftau-Zyklen des qPCR Master Buffer (2x) sollte minimiert werden. Sowohl Master Enzym Mix als auch ROX Lösung sollten auf Eis gelagert werden. Die Reaktionsansätze sollten generell so wenig Licht wie möglich ausgesetzt werden, um einer Einbuße der Fluoreszenzsignalintensität entgegenzuwirken.
- Konzentrationsunterschiede vermeiden.** qRT-PCR Master Buffer (2x) sollte vor Gebrauch vollständig aufgetaut und vorsichtig gevortext werden, um Konzentrationsunterschiede zu vermeiden.
- Empfohlenes Reaktionsvolumen 25 µl.** Für die Verwendung in den meisten qPCR-Analysegeräten empfehlen wir ein Reaktionsvolumen von 25 µl. Davon abweichend können auch andere Reaktionsvolumina verwendet werden, beispielsweise für den Einsatz in speziellen qPCR-Geräten.
- Die optimale Amplikonlänge** für RealTime-qPCR unter Verwendung von SYBR Green I ist 70 - 200 bp.
- Primer über Exon-Exon-Grenzen legen.** Um einer Amplifikation ggf. kontaminierender genomischer DNA entgegenzuwirken, empfiehlt es sich, nach Möglichkeit die Primer über Exon-Exon-Grenzen hinweg zu platzieren. Oft existieren spezielle, von Forschungsinstitutionen bereitgestellte Datenbanken, die eine Hilfestellung beim Design passender Primerpaare anbieten. Beispielsweise kann für *Homo sapiens* - spezifische Primerpaare die folgende Online-Datenbank verwendet werden: <http://primerdepot.nci.nih.gov/>
- Auf Eis pipettieren.** RT-qPCR Reaktionen sollten auf Eis zusammengefügt werden, um möglichen Degradationen der RNA-Vorlage ("Template") entgegenzuwirken.
- Pipettierreihenfolge.** Zunächst wird der Reaktions-Mastermix, bestehend aus Master Enzym Mix, qPCR Master Puffer, Primer und nukleasefreiem Wasser, sowie optional UNG und ROX gemischt und in die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Anschließend wird die RNA-Vorlage (etwa 500 ng RNA je Reaktion oder weniger) zu den individuellen PCR-Reaktionsgefäßen gegeben. Die Reaktionsansätze sollten anschließend kurz anzentrifugiert werden.
- Vor Analyse Luftblasen entfernen.** Vor Einsetzen der Proben in das qPCR-Gerät sollte optisch überprüft werden, ob Luftblasen in den einzelnen qPCR Reaktionsansätzen verblieben sind. Eventuell vorhandene Luftblasen stören die optische Detektion und sollten durch kurzes Zentrifugieren entfernt werden. Die Zentrifugation sollte so oft wiederholt werden, bis keine Luftblasen im Ansatz zurückbleiben. Anschließend werden die Proben in das qPCR Gerät überführt und die Analyse gestartet.
- Temperaturspezifikation der Reversen Transkriptase.** Die speziell für das Kit entwickelte Reverse Transkriptase arbeitet in einem Temperaturbereich zwischen 25°C und 55°C. Die empfohlene Starttemperatur für die Reverse Transkriptase ist 50°C. Für Experimente mit speziellen Anforderungen kann die Reaktionstemperatur innerhalb der Grenzen der o.g. Spezifikation problemlos angepasst werden.
- MgCl₂.** Die Standardkonzentration von MgCl₂ in Echtzeit- RT-qPCR-Reaktionen ist 3 mM (wie in 1 x konzentriertem qRT-PCR Master Buffer 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.
- Primerkonzentration.** Die empfohlene Anfangskonzentration je Primer beträgt 0.3 - 0.5 µM, kann aber, je nach Reaktionsanforderungen, in einem Bereich zwischen 0.1 µM und 1.0 µM angepasst werden. 0.4 µM ist die empfohlene Anfangskonzentration. Wird die Primerkonzentration erhöht, kann die PCR-Effizienz steigen, aber die Spezifität der PCR-Reaktion nimmt ab. Eine Verminderung der Primerkonzentration senkt die PCR-Ausbeute und erhöht die Spezifität der Reaktion. 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.
- Adjustieren des Schwellenwertes.** Der Detektionsschwellenwert ("threshold value") sollte vor jedem RT-qPCR Lauf neu adjustiert 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. Dieser Korrekturfaktor dient zur Korrektur für Variationen bei Fluoreszenzanregung oder zur Korrektur von Pipettiergenauigkeiten. Zur Bestimmung wird eine spezielle, externe "well factor" - Platte gemäß den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt.



SG 1-Step RT-qPCR Master Mix

REALTIME PCR PROTOKOLL

Programm für das Echtzeit-PCR-Gerät:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Reverse Transkription	50°C	30 min	1
Einleitende Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	94°C	15 s	35-45
Primer-Bindung	50-60°C	30 s	
Verlängerung	72°C	20 s	
Optional: Datenerfassung	X°C	15 s	
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

1. **Optionale Komponente: Thermolabile UNG.** Es ist optional möglich, thermolabile Uracil-N Glycosylase (UNG) einzusetzen, um möglichen "carryover" - Kontaminationen vorzubeugen, etwa durch Verschleppung von PCR-Produkten aus vorher durchgeführten qPCR oder RT-qPCR-Analysen. qPCR-Amplikons oder RT-qPCR Produkte, die unter Verwendung eines der Produkte, SG qPCR Master Mix, Fast SG qPCR Master Mix oder SG 1-Step RT-qPCR Kit synthetisiert wurden, sind durch den teilweisen Einbau von Uracil- anstelle von Thymin-Positionen "markiert". UNG entfernt Uracil von beliebigen dU-enthaltenden, verschleppten Amplifikationsprodukten und erzeugt basenfreie Positionen. Abasische Positionen ("abasic sites") sind Angriffspunkte für thermische Hydrolyse und Degradation unerwünschter DNA während des nachfolgenden Denaturierungsschrittes (95°C für 3 min). Achtung: UNG von E. Coli sollte auf keinen Fall verwendet werden, da diese nicht-thermolabile UNG jegliche neu synthetisierte cDNA degradieren würde.
2. **Thermolabile UNG, Inaktivierung.** Thermolabile UNG wird bei 50°C thermisch inaktiviert. Sowohl die Reverse Transkriptase als auch der Taq-inhibierende monoklonale Antikörper sind bei Temperaturen bis 55°C zunächst stabil und werden erst im ersten Denaturierungsschritt der PCR durch Hitze inaktiviert (95°C für 3 min). Zur Denaturierung des anti-Taq Antikörpers und der UNG sollte die initiale Denaturierung für mindestens 2 - 5 min durchgeführt werden. Sollte keine UNG eingesetzt werden, kann der einleitende Denaturierungsschritt auf eine Dauer von 2 min begrenzt werden.
3. **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.
4. **Datenerfassung und Primer-Dimere.** Die Datenerfassung sollte während des Kettenverlängerungsschrittes ("extension") durchgeführt werden. Es besteht die Möglichkeit, verfälschende Fluoreszenzsignale aus unerwünschter Amplifikation von Primer-Dimeren zu unterdrücken, indem ein zusätzlicher Datenerfassungsschritt zum Protokoll hinzugefügt wird. Möglich ist das immer dann, wenn die Schmelztemperatur (T_m) des Primer-Dimeres deutlich niedriger als die T_m des spezifischen Produktes liegt. Die T_m wird durch die Schmelzkurvenanalyse berechnet. Während der Datenerfassung sollte die Temperatur über der T_m des Primer-Dimers liegen, aber etwa 3°C unterhalb der T_m des spezifischen Produktes.
5. **Qualitätskontrolle mittels 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.