

TRIPLE M

M³ Multiplex Master Mix - PCR (2x)

PCR System mit monoklonalem Antikörper für automatisierten "Hot Start"

Multiplex PCR Master Mix (2x)
(Taq DNA Polymerase)

Artikel Nr.	Größe
E2820-01	50 Reaktionen je 50 µl
E2820-02	100 Reaktionen je 50 µl

Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°C (langfristig, mehr als 12 Monate haltbar) oder bei +4°C bis zu zwei Monate.

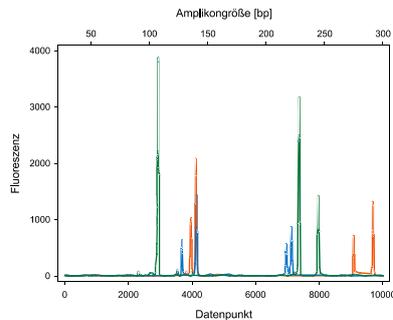


Abb. 1: Gleichzeitige Multiplex-PCR-Amplifikation von 11 Banden aus menschlicher, genomischer DNA mit 6 verschiedenen Primerpaaren. Je ein Primer jedes Paares trägt ein Fluoreszenzlabel: FAM (blau), TET (grün) und HEX (gelb). Amplifizierte Loci: Amelogenin (geschlechtsspezifisch) und fünf STRs. Reaktionsparameter: 20 µl Reaktionsvolumen, 5 ng menschliche DNA, 0,2 µM je Primer.

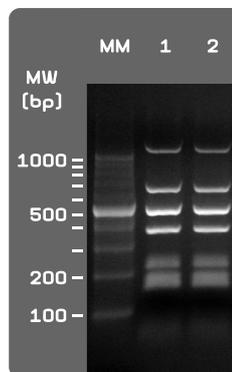


Abb. 2: Multiplex-PCR-Amplifikation aus menschlicher, genomischer DNA mit 6 verschiedenen Primerpaaren (mit Primerpaaren für vWA und D21S11 STRs). Reaktionsparameter: 20 µl Reaktionsvolumen, 10 ng menschliche DNA, 0,2 µM je Primer.

Multiplex PCR Master Mix mit speziellen Optimierungen für gleichmäßige Amplifikation einer Vielzahl verschiedener PCR Fragmente in einer einzigen PCR-Reaktion.

Beschreibung:

- Der Multiplex PCR Master Mix wurde speziell entwickelt, um in einer einzigen PCR-Reaktion gleichzeitig mehrere verschiedene PCR-Amplifikate aus unterschiedlichen Abschnitten der Template-DNA zu synthetisieren.
- Multiplex PCR Master Mix ermöglicht ein reproduzierbares, zeitsparendes und kontaminationsfreies Ansetzen von PCR-Reaktionen, weil die Anzahl der erforderlichen Pipettierschritte minimiert wird.
- Multiplex PCR Master Mix (2x) ist eine gebrauchsfertig abgestimmte Mischung aus Perpetual Taq DNA Polymerase, optimiertem Reaktionspuffer, MgCl₂, dNTPs und weiterer Zusätze.
- Perpetual Taq besteht aus Taq DNA-Polymerase, die reversibel an einen monoklonalen anti-Taq Antikörper gebunden ist. Die Replikationsaktivität des Enzyms ist für die Zeitspanne bis zum ersten Denaturierungsschritt blockiert - wichtig, um Produkte unspezifischer Primerextensionen wie Primer-Dimere zu verhindern. Ermöglicht das bequeme Zusammenpipettieren von PCR - Reaktionen bei Raumtemperatur.
- Der monoklonale anti-Taq Antikörper denaturiert erst bei einer Temperatur von 70°C irreversibel und besitzt somit hohe thermische Stabilität.
- Die zunächst durch den monoklonalen Antikörper blockierte DNA Polymerase-Aktivität wird während des einleitenden Denaturierungsschrittes wieder hergestellt. Hierzu muss der Reaktionsmix für zwei Minuten auf 94-95°C erhitzt werden.
- "Hot Start" PCR verhindert die unspezifische Verlängerung (Extension) von DNA-Fragmenten und die Ausbildung von Primer-Dimeren durch unspezifisches Priming ("mispriming") während dem Zusammenfügen der Reaktionskomponenten. Hierdurch erhöht sich die PCR-Spezifität, die Ausbeute und die Empfindlichkeit der Reaktion im Vergleich zu herkömmlichen PCR-Reaktionen. Eine reproduzierbare, hohe Qualität der Multiplex-PCR wird sicher gestellt.

Multiplex PCR Master Mix (2x), Packungsinhalt:

Komponente	Best. Nr. E2820-01 50 Reaktionen je 50 µl	Best. Nr. E2820-02 100 Reaktionen je 50 µl
Multiplex PCR Master Mix (2x)	1 x 1.3 ml	2 x 1.3 ml
10 x Color Load Puffer	0.3 ml	0.6 ml
Wasser, nukleasefrei	1 x 1.3 ml	2 x 1.3 ml

10 x Color Load:

10 x Color Load enthält zwei Farbstoffe und eine Gel-Schwerelösung. Mit diesem Puffer werden Aliquots der PCR-Reaktion direkt auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, 3'-Exonuklease-, sowie einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt, dass typische Präparationen zu mehr als 95 % rein sind.



M³ Multiplex Master Mix - PCR

PCR PROTOKOLL

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen je Reaktion	Endkonzentration
Multiplex PCR Master Mix (2x)	25 µl	1 x (2.5 mM MgCl ₂)
10x Primer-Mix, 2 µM je Primer	5 µl	0.2 µM
Optional: 10x Color Load	5 µl	1 x
Vorlagen- ("Template") DNA	Variabel	<0.3 µg/50 µl
Steriles, doppelt destilliertes Wasser	Auf 50 µl	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

- Ein Master Reaktionsmix, bestehend aus allen Reaktionskomponenten außer der DNA-Vorlage ("DNA-Template") wird zusammengefügt und gleichmäßig vermischt.
- Der gründlich gemischte Master-Reaktionsmix wird in geeigneten Volumina in die einzelnen Reaktionsgefäße aliquotiert.
- In jedes Reaktionsgefäß wird die jeweilige, zu untersuchende Vorlagen-DNA zugegeben (300 ng/Reaktion).
- Die Flüssigkeit wird durch kurzes Anzentrifugieren am Boden der Reaktionsgefäße gesammelt. Etwaig verbliebene Luftblasen werden durch das Anzentrifugieren entfernt.
- Die Reaktionsgefäße werden in das PCR-Gerät überführt und die PCR-Reaktion wird gestartet.

Generische Formel zur Berechnung der Kopienanzahl von Vorlagen-DNA-Molekülen ("Template DNA") aus der Gesamt-DNA-Menge:

$$\text{Kopienanzahl Vorlagen-DNA [Moleküle]} =$$

$$\frac{\text{DNA Menge [ng]} \cdot 6.022 \cdot 10^{23} [\text{Moleküle mol}^{-1}]}{\text{Genomische DNA Länge [kb]} \cdot 616 [\text{g mol}^{-1} \text{bp}^{-1}]} \cdot \frac{10^{-3} [\text{kb bp}^{-1}]}{10^9 [\text{ng g}^{-1}]}$$

Optimal: 10⁴ Kopien der DNA-Vorlage
Maximal: 0,3 µg DNA oder weniger

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm):

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Einleitende Denaturierung	94-95°C	2-5 min	1
Denaturierung	94°C	20-30 s	35
Annealing	56-64°C	90 s	
Extension	72°C	30 s (für Amplifika- te < 500 bp)	
		90 s (für Amplifika- te < 1.500 bp)	
Finale Extension	68°C	7 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	1

Hinweise:

1. **Konzentrationsunterschiede vermeiden:** Multiplex PCR Master Mix (2x) vollständig auftauen, vorsichtig vortexen und kurz anzentrifugieren, um lokale Unterschiede in der Salzkonzentration zu vermeiden.
2. **Raumtemperatur:** Die Reaktionsansätze können bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die Aktivität der Taq DNA Polymerase zunächst durch den monoklonalen Antikörper reversibel inhibiert wird. Ein Vorheizen des PCR-Gerätes auf 95°C ist nicht erforderlich.
3. **MgCl₂:** Die Standard-Endkonzentration von MgCl₂ in Multiplex PCR-Reaktionen beträgt 2.5 mM (wie in 1 x Multiplex PCR 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 50 µl Reaktion um 0.5 mM.
4. **Primerkonzentration:** Eine Endkonzentration von 0,2 µM je einzelner Primer ist üblicherweise optimal. Die Primerkonzentration kann bei Bedarf in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,2 µM und 0,4 µM je Primer eingestellt werden.
5. **Farbiger Ladepuffer:** Der 10x Color Load Puffer ermöglicht, Aliquots von PCR Reaktionen direkt auf ein Agarose-Gel aufzutragen - ohne Verwendung eines Ladepuffers. Enthalten sind zwei elektrophoretisch trennbare Farbstoffe (rot und gelb) sowie Gel-Schwererlösung. In einem 1 % [w/v] Agarose-Gel migriert der rote Farbstoff in Höhe von 600 bp, der gelbe Farbstoff schneller als 20 bp. Obwohl die Farbstoffe anschließende enzymatische Reaktionen meist nicht beeinflussen, schadet es nicht, die PCR-Produkte vor nachfolgenden Reaktionen aufzureinigen.
6. **PCR Additive / "PCR enhancer":** In den meisten Fällen ist es nicht erforderlich, PCR-Reaktionsansätze durch Additive zu ergänzen. Für einige, schwierig zu kopierende DNA-Vorlagen kann es sinnvoll sein, Additive wie DMSO beizumischen. Schwierig amplifizierbare Vorlagen sind z.B. GC-reiche Sequenzabschnitte oder Sequenzen mit komplexen Sekundärstrukturen. Ein sinnvoller Konzentrationsbereich für DMSO ist 2%-4% [v/v], mit 3% als Startkonzentration für weitere Optimierung.

Hinweise:

1. **Initiale Denaturierung:** Eine einleitende Denaturierung von 2 min Dauer ist zwingend notwendig, um den Antikörper zu denaturieren und die Aktivität der DNA Polymerase wieder herzustellen.
2. **Primerbindung / Annealing:** Die Bindungstemperatur muss für jede Primermischung spezifisch angepasst werden. Sie orientiert sich jeweils am Primer mit der niedrigsten Schmelztemperatur (T_m). Um die optimale Bindungstemperatur zu ermitteln, sollte eine Temperaturgradienten-PCR durchgeführt werden, beinhaltend geeignete Vorlagen-DNA und eine Mischung aller Primer.