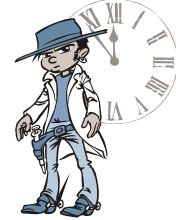


Probe qPCR Master Mix (2x) + ROX

REAL TIME PCR KIT FÜR MARKIERTE SONDEN



Kit-Komponenten:

Probe qPCR Master Mix (2x)

Komponente	Artikel Nr. E0421-01	Artikel Nr. E0421-02	Artikel Nr. E0421-03
	100 Reaktionen, je 25 µl, 2.5 ml [1x] Endvolumen	200 Reaktionen, je 25 µl, 5 ml [1x] Endvolumen	1000 Reakt., je 25 µl, 25 ml [1x] Endvolumen
Probe qPCR Master Mix (2x)	1 x 1.25 ml	2 x 1.25 ml	10 x 1.25 ml
ROX Lösung, 25 µM	55 µl	110 µl	530 µl
UNG (Uracil-N- Glycosylase) 1 U/µl	30 µl	55 µl	270 µl
Wasser, nukleasefrei	1 x 1.25 ml	2 x 1.25 ml	10 x 1.25 ml

Lagerung: Lagerung bei -20°C oder bei 4°C für bis zu 1 Monat.

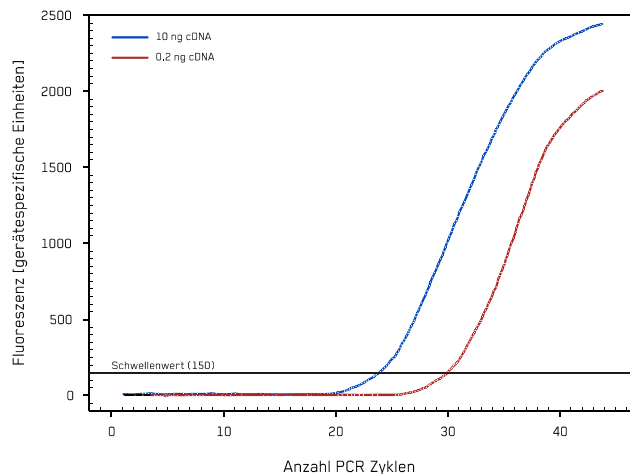
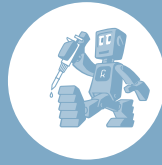


Abbildung 1: Sondenbasierte Real Time PCR mit vorgeschaltetem UNG-Dekontaminationsschritt. Verwendet wurden GAPDH-spezifische Primer sowie eine innerhalb des Amplikons bindende, HEX-markierte Sonde. Vorlagen DNA waren jeweils 10 ng und 0,2 ng cDNA, dargestellt aus RNA von humanen Leukozyten. Reaktionen wurden jeweils als Duplikate durchgeführt. CT Werte der Duplikate waren nahezu identisch. Jeweils eine der nahezu identischen Amplifikationskurven ist dargestellt. Die Effizienz der PCR - Reaktion war 98%.

Beschreibung:

- Der Probe qPCR Master Mix (2x) ist eine universell einsetzbare, gebrauchsfertige Enzympräparation. Die Enzymformulierung ist geeignet für quantitative Echtzeit-PCR ("Real-Time PCR") und für zweistufige Echtzeit-PCR ("Two-Step RealTime-PCR"). Sie ist kompatibel mit den meisten gängigen Echtzeit-PCR-Geräten.
- Der Mix enthält Perpetual *Taq* DNA Polymerase (Hot Start), optimierte Reaktionspuffer und dNTPs (dTTP ist teilweise durch dUTP ersetzt).
- Perpetual *Taq* DNA Polymerase besteht aus rekombinanter, hochaktiver *Taq* DNA Polymerase, an einen spezifischen, sorgfältig aufgereinigten Anti-*Taq* Antikörper gebunden. Durch diese Bindung wird die *Taq*-Aktivität bei Raumtemperatur zunächst blockiert. Erst nach einer einleitenden Denaturierung für zwei Minuten bei 95°C wird die Polymerase aktiviert. Ist die Polymerase bei Raumtemperatur inaktiv, wird die Ausbildung von Primer-Dimeren durch unspezifische Wechselwirkungen ("Annealing") während der Reaktionsvorbereitung verhindert. Die Spezifität und Sensitivität der PCR-Reaktion wird erhöht und quantitative PCR-Messungen werden nicht durch dsDNA-Bildung aus Amplifikation von Primer-Dimeren verfälscht.
- HotStart Perpetual *Taq* DNA Polymerase ermöglicht komfortables Zusammenfügen der Reaktion bei Raumtemperatur.
- Probe qPCR Master Mix (2x) enthält dUTP als partiellen Ersatz für dTTP. Deshalb kann optional eine Uracil-N-Glycosylase (UNG) zugefügt werden, um Kontaminationen durch Verschleppung zwischen verschiedenen Reaktionsansätzen entgegenzuwirken. UNG entfernt Uracil von beliebigen dU-enhaltenden, verschleppten Amplifikationsprodukten und erzeugt basenfreie Positionen, Angriffspunkte für Hydrolyse und Degradation unerwünschter DNA während des nachfolgenden Denaturierungsschrittes. Dagegen enthält die zu analysierende Vorlagen-DNA (das "Template") keine dU-Positionen und wird nicht hydrolysiert.
- Der Probe qPCR Master Mix (2x) wird in zwei Varianten angeboten: Ohne ROX und mit separat abgefüllter ROX Lösung. ROX Lösung wird für bestimmte Echtzeit-PCR-Geräte benötigt: Zwingend für Systeme von Applied Biosystems und optional für Systeme von Agilent / Stratagene. Unterschiedliche Reaktionsvolumina und Fluktuationen in der Fluoreszenz können Veränderungen im Fluoreszenzsignal bewirken, die nicht auf quantitative PCR zurückzuführen sind. Solche Variationen können durch ROX kompensiert werden. Der Farbstoff ROX tritt nicht mit dsDNA in Wechselwirkung und eignet sich deshalb gut als konstante Basislinie zur Erfassung geringer, PCR-unabhängiger Variationen. ROX beeinflusst die PCR-Reaktion nicht und beeinflusst die Messung der Echtzeit-PCR auf keinem einzigen Instrument. Je nach Echtzeit-PCR-Gerät werden unterschiedliche Mengen an ROX pro Reaktionsansatz empfohlen (siehe Tabelle unten).



Probe qPCR Master Mix (2x)

REAL TIME PCR PROTOKOLL (1)

qPCR- Protokoll

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

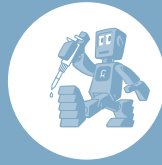
Instrument	Benötigte ROX-Menge je 25 µl Reaktion	Endgültige ROX-Konzentration
Applied Biosystems: 7300, 7900HT, StepOne, StepOnePlus, ABI PRISM 7000 und 7700	0.3-0.5 µl	300-500 nM
Applied Biosystems: 7500 Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0.3-0.5 µl 10 x verdünnt (in Wasser)	30-50 nM
Weitere Echtzeit-PCR-Geräte: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

Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
Probe qPCR Master Mix (2x)	12.5 µl	1 x 3.5 mM MgCl ₂
5'-Primer	Variabel	0.5 µM
3'-Primer	Variabel	0.5 µM
Probe	Variabel	0.2 µM
Vorlagen-DNA	Variabel	500 ng
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: 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.** ROX Lösung sollte 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.
- Die optimale Amplikonlänge** für Echtzeit-PCR auf Basis molekularer Proben beträgt 70 - 150 bp.
- Vor Gebrauch mischen.** Vor Gebrauch alle Lösungen auftauen, schonend vortexen und kurz an zentrifugieren.
- Reaktion ansetzen bei Raumtemperatur.** PCR-Reaktionen werden mit dem Probe 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.
- Mischen und aliquotieren.** 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.
- Luftblasenbildung vermeiden.** Kurz an zentrifugieren, um die Reaktionskomponenten am Gefäßboden zu sammeln und Luftblasen zu entfernen. Luftblasen beeinträchtigen die quantitative Fluoreszenzmessung empfindlich.
- Start der Messung.** Die Proben werden in das Echtzeit-PCR-Gerät gestellt und das Programm zur Fluoreszenzmessung gestartet.
- MgCl₂ Konzentration.** Die Standardkonzentration von MgCl₂ in Echtzeit-PCR-Reaktionen ist 3.5 mM (wie in 1 x Probe 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.
- Optimale Primerkonzentration.** Eine Primerkonzentration von 0.4 - 0.5 µM ist in den meisten Fällen optimal, kann aber für spezielle Reaktionen in einem Konzentrationsbereich von 0.4 µM bis 1 µM angepasst werden. Die empfohlene Anfangskonzentration beträgt 0.5 µM. Wird die Primerkonzentration erhöht, kann die PCR-Effizienz steigen, aber die PCR-Spezifität nimmt ab. Die optimale Primerkonzentration hängt sowohl von der einzelnen Reaktion als auch vom verwendeten Echtzeit-PCR-Gerät ab.
- Die optimale Schmelztemperatur (Tm)** der Primer sollte 60°C betragen. Die Tm der zweifach markierten Proben sollte 8-10°C über der Tm der Primer liegen.
- 5'-G Quenching.** Das 5'-Ende der zweifach markierten Probe darf kein G enthalten, um ein Abfangen des emittierten Fluoreszenzsignales (quenching) zu verhindern.
- Schwellenwertanpassung.** Der Schwellenwert (threshold value) für die Analyse soll vor jeder Messung eingestellt werden.



Probe qPCR Master Mix (2x)

REALTIME PCR PROTOKOLL (2)

qPCR- Protokoll - Echtzeit-PCR-Bedingungen

2-stufiges Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Optional: UNG- Vorbehandlung	50°C	2 min	1
Einleitende Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	94°C	15 s	35-50
Primer-Bindung / Verlängerung	60°C	60 s	
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

3-stufiges Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Optional: UNG- Vorbehandlung	50°C	2 min	1
Einleitende Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	94°C	15 s	35-50
Primer-Bindung	50-60°C	30 s	
Verlängerung	72°C	30 s	
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

Hinweise:

- 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 - 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.