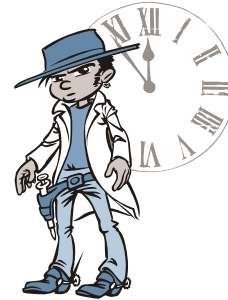


TRIPLE M

M³ Multiplex Master Mix Probe qPCR (2x)

REAL TIME PCR KIT FÜR MARKIERTE SONDEN



Kit-Komponenten:

Probe qPCR Master Mix (2x)

Komponente	Artikel Nr. E0424-01	Artikel Nr. E0424-02	Artikel Nr. E0424-03
	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
M ³ Multiplex Probe qPCR Master Mix (2x) (MP qPCR Master Mix)	1 x 1.25 ml	2 x 1.25 ml	10 x 1.25 ml
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.

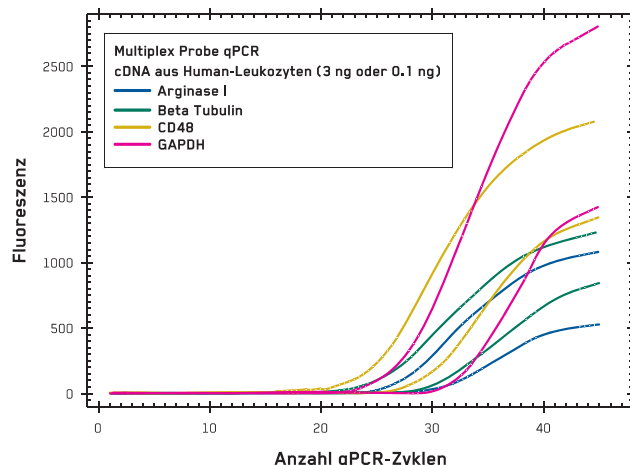
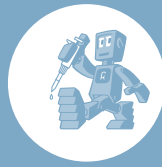


Abbildung 1: M³ Multiplex Master Mix - Probe qPCR (= MP Probe qPCR Master Mix), sondenbasierte Real Time PCR mit vorgeschaltetem UNG-Dekontaminationschritt. Verwendet wurden spezifische Primer sowie eine innerhalb des Amplikons bindende, fluoreszenzmarkierte Sonden (FAM, HEX, Texas Red, Cy5). Vorlagen DNA waren jeweils 3 ng und 0,1 ng cDNA, dargestellt aus RNA von humanen Leukozyten. CT Werte der Duplikate waren nahezu identisch. Die Effizienz der PCR - Reaktion war mindestens 85% oder höher.

Beschreibung:

- Der M³ Multiplex Master Mix - Probe qPCR (2x) ist eine universell einsetzbare, gebrauchsfertige Enzympräparation. Die Enzymformulierung ist geeignet für quantitative Multiplex-Echtzeit-PCR ("Real-Time PCR") und für zweistufige Echtzeit-PCR ("Two-Step RealTime-PCR"). Sie ist kompatibel mit den meisten gängigen Echtzeit-PCR-Geräten.
- Abhängig vom verwendeten qPCR-Gerät können bis zu fünf Proben je qPCR-Reaktionsansatz ("Assay") gleichzeitig gemessen und quantifiziert werden.
- 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.
- M³ Multiplex Master Mix - Probe qPCR 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 M³ Multiplex Master Mix - Probe qPCR 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).



M³ Multiplex Master Mix Probe qPCR (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
MP Probe qPCR Master Mix (2x)	12.5 µl	1 x
20 x Primer-Sonde Mix 1	1,25 µl	0.2 µM 5'-Primer 1 0.2 µM 3'-Primer 1 0.2 µM Sonde 1
20 x Primer-Sonde Mix 2	1,25 µl	0.2 µM 5'-Primer 2 0.2 µM 3'-Primer 2 0.2 µM Sonde 2
Optional: 20 x Primer-Sonde Mix 3 und 4	Je 1,25 µl	0.2 µM 5'-Primer 3, 4 0.2 µM 3'-Primer 3, 4 0.2 µM Sonde 3, 4
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: Thermolabile 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 - 200 bp.
- Vor Gebrauch mischen.** Vor Gebrauch alle Lösungen auftauen, schonend vortexen und kurz an zentrifugieren.
- Reaktion ansetzen bei Raumtemperatur.** PCR-Reaktionen werden mit dem M³ Multiplex Master Mix - Probe qPCR (2x) bei Raumtemperatur angesetzt.
- Reaktions-Mastermix.** Bei hohem Probendurchsatz kann ein Reaktions-Master Mix mit allen Komponenten bis auf Vorlagen-DNA (Template) vorbereitet werden.
- 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 3.0 mM (wie in 1 x Probe qPCR Master Mix enthalten) - für die meisten PCR Reaktionen optimal. Für höhere MgCl₂ Konzentrationen kann 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 0.2 µM ist in den meisten Fällen optimal, kann aber für spezielle Reaktionen in einem Konzentrationsbereich von 0.2 µM bis 0.4 µM angepasst werden. Die empfohlene Anfangskonzentration beträgt 0.2 µM. Wird die Primerkonzentration erhöht, steigt die PCR-Effizienz, aber die PCR-Spezifität nimmt ab. Die optimale Primerkonzentration hängt von der jeweiligen Reaktion als auch vom verwendeten Echtzeit-PCR-Gerät ab.
- Optimale Sondenkonzentration.** Eine Sondenkonzentration von 0.2 µM im Ansatz führt meist zu guten Ergebnissen. Abhängig von Synthese- und Aufreinigungsmethode kann die optimale Sondenkonzentration im Bereich zwischen 0.1 µM bis 0.4 µM variieren.
- Die optimale Schmelztemperatur (T_m)** der Primer sollte 60°C betragen. Die T_m der zweifach markierten Proben sollte 8-10°C über der T_m 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.

M³ Multiplex Master Mix - Probe qPCR (2x) REALTIME PCR PROTOKOLL (2)

qPCR- Protokoll - Echtzeit-PCR-Bedingungen

2-stufiges Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Optional: UNG- Vorbehandlung	37°C	2 min	1
Einleitende De- naturatierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	15 s	40-50
Primer-Bindung / Verlängerung	60°C	90 s	
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

Hinweise:

- 2-stufiges Reaktionsprotokoll.** Der M³ Multiplex Master Mix - Probe qPCR wurde für Verwendung eines zweistufigen Reaktionsprotokolles entwickelt. Das Protokoll führt auch mit Primern unterhalb einer Schmelztemperatur von 60°C zu guten Ergebnissen.
- Einleitender Uracil-Glycosylase-Inkubationsschritt.** Wird Uracil-N-Glycosylase (UNG) optional eingesetzt, muss ein Inkubationsschritt bei 37°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.
- 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 (siehe Abbildung 2).

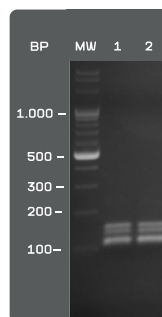


Abbildung 1: Kontrolle von Multiplex-qPCR Amplikons per Agarose-Gelelektrophorese. qPCR Amplifikation unter Verwendung von EURx M³ Multiplex Master Mix - qPCR Probe (siehe Abbildung 1).

Spur 1: EURx Perfect 100 bp DNA Leiter (Art. Nr. E3134),
Spuren 2,3: Reaktionen als Duplikate aus 3 ng humaner Leukozyten-cDNA.

Banden:

- 104 bp und 108 bp, als eine Bande - CD48 und GAPDH,
- 131 bp - Beta-Tubulin,
- 149 bp - Arginase I.

Die Banden erscheinen in vergleichbarer Intensität, mit einer klar begrenzten, definierten Morphologie, mit scharfen, genau begrenzten Rändern, ohne ungewöhnliches Migrationsverhalten wie Schlieren oder Schmier und ohne Anzeichen der Ausbildung von PCR - Artefakten.