



Direct Tissue PCR Kit

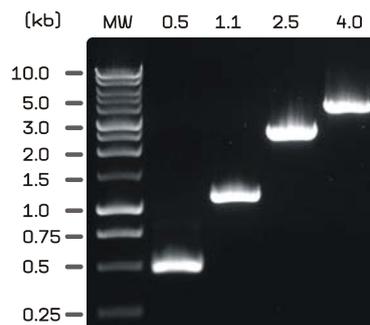


Direct Tissue PCR Kit

- für PCR Reaktionen aus Blut -

Artikel Nr.	Größe
E0940-01	100 Reaktionen a 50 µl
E0940-02	500 Reaktionen a 50 µl

Lagerbedingungen:
Lagerung bei -20°C



Amplifikation mit dem EURx Direct Tissue PCR Kit.

Spur M: Marker: EURx Perfect Plus 1 kb Ladder (Best.Nr. E3131).
Spuren 0.5 bis 4 kb: Direkte PCR Amplifikation aus menschlicher Leber mittels des "Extract"-Protokolls ohne vorherige DNA-Extraktion bzw. Reinigung.

Das Direct Tissue PCR Kit enthält:

1. 2 x Tissue PCR Master Mix
2. Tissue DNA Polymerase
3. Extraktionspuffer
4. Lysis-Verstärker
5. Wasser, nukleasefrei

Das Direct Tissue PCR Kit ermöglicht direkte PCR-Reaktionen aus Gewebeproben ohne vorherige DNA-Extraktion bzw. -Reinigung.

Beschreibung:

- Direkte PCR Amplifikation aus Gewebeproben wie z.B. menschliches und tierisches Gewebe, Mausschwanz- und Mausohr-Proben, Zebrafisch-Flossen, *Drosophila*, menschliches Haar, Speichel und andere Proben.
- Für frisches wie gefrorenes Probenmaterial geeignet.
- Das Direct Tissue PCR Kit ist ein "Hot Start" Kit. Es enthält eine thermostabile DNA Polymerase mit speziellen genetischen Anpassungen für hohe Toleranz gegen PCR-Inhibitoren aus Blut.
- Das Enzym ist zunächst bei Raumtemperatur inaktiv. Die Aktivität der DNA Polymerase wird nach einem "Hot Start" während einer 7-minütigen initialen Denaturierung bei 95°C wieder hergestellt.
- Die Tissue DNA Polymerase katalysiert den Einbau von Nucleotiden zu Duplex-DNA in 5'→3' - Richtung.
- Das Enzym besitzt 3'→5' Proofreading Aktivität und erzielt damit eine zehn Mal höhere Genauigkeit als Taq DNA Polymerase.
- 5'→3' Exonuklease-Aktivität ist nicht vorhanden. Bei Erreichen des 5'-Endes eines dsDNA Abschnittes während der Amplifikation hält das Enzym an.
- Das Enzym erzeugt stumpfe Enden (blunt).
- Eine erhöhte Polymerase-Prozessivität erlaubt kurze Extensionszeiten.
- **Die PCR-Bedingungen können, bedingt durch genetische Anpassungen des Enzyms, von Standard-PCR-Bedingungen abweichen. Das betrifft vor allem die Primerfixierungstemperatur (Annealing).**
- Zwei verschiedene Protokolle können durchgeführt werden: Das "Direkte" und das "Extrakt" - Protokoll.
- Der Master Mix enthält ein Farbstoffgemisch mit zwei Farbstoffen, die für direkte Gelbeladung verwendet werden können.
- Das Direct Tissue PCR Kit ermöglicht die Amplifikation von Produkten mit mehr als 4 kb Länge.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

20 mM Tris-HCl (pH 8.0 bei 22°C), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 50 % [v/v] Glycerin und Stabilisatoren.

[2x] Tissue PCR Master Mix:

Der Master Mix enthält 2x konzentrierten, optimierten PCR-Puffer, 5 mM MgCl₂, dNTPs und zwei Farbstoffe zur direkten Gelbeladung.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, 3'-Exonuklease-, sowie einzel- und doppelsträngige DNase Aktivitäten geprüft. Typische Präparationen sind zu mehr als 95 % rein, wie aufgrund von SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese beurteilt werden kann.



Direct Tissue PCR Kit

PCR PROTOKOLL (1)

Probenvorbereitung

Um kleine und gleichförmige Probenstücke zu erhalten, wird die Benutzung eines Skalpell oder eines Stanzers mit einem Lochdurchmesser von 0,3-0,5 mm empfohlen. Wenn der Stanzler bzw. das Skalpell wiederverwendet werden soll, müssen die Schneide- bzw. Stanzecken gereinigt werden, um Kreuzkontaminationen zwischen verschiedenen Probe zu verhindern. Zur Reinigung sollte 2% NaClO-Lösung verwendet werden.

Wahl des Protokolles

Das Direct Tissue PCR Kit enthält Reagenzien für zwei unterschiedliche Protokolle die Direkte und die Extrakt-Methode. Mit wenigen Ausnahmen sind beide Protokolle für alle Probenmaterialien geeignet.

Das Extrakt-Protokoll wird empfohlen für:

- erste Arbeiten mit neuen Probenmaterialien oder mit einem neuen Primer-Paar,
- bei schwierigen oder langen Amplikons (größer 1 kb),
- bei vielen parallelen Reaktionen aus derselben Probe.

Für das Extrakt-Protokoll können 20-50 µl Reaktionsvolumen verwendet werden, das Direkt-Protokoll eignet sich nur für Reaktionsvolumina von 50 µl. Das im Extraktionspuffer gelagerte Probenmaterial ist stabil und geeignet als Ausgangsmaterial für PCR während vier Wochen Lagerung bei +4°C oder bei -20°C.

Feste Proben

Probenmaterial:

- 0,35-0,5 mm Gewebeprobe (von Mensch oder Tier),
- 1-3 Haarwurzeln,
- 1 x 1 mm Proben von Nagel,
- 1 x 1 mm Proben von Zahn.

Direktes Protokoll

Die Probe wird in eine PCR-Reaktion eines Gesamtvolumens von 50 µl überführt. Anschließend wird eine PCR nach dem Protokoll auf der folgenden Seite durchgeführt.

Nach Ablauf der PCR wird 1,5 µl Lysis-Enhancer zu 50 µl PCR Reaktionsvolumen hinzugefügt und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wird die Reaktion für eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, um unlösliche Reste der Gewebepollen abzutrennen.

Extrakt-Protokoll

Das Probenmaterial wird in 20 µl Extraktionspuffer überführt. 0,5 µl Lysis-Enhancer wird zur Probe zugefügt. Für größere Gewebepollen werden die Volumina von Extraktionspuffer und Lysis-Enhancer entsprechend angepasst. Das Reaktionsgefäß wird kurz geschüttelt, um die Probe zu mischen und kurz anzentrifugiert, um das Probenmaterial luftblasenfrei am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Das Lysat wird für 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für 5 Minuten bei 98°C inkubiert. Anschließend wird das Lysat erneut herunter zentrifugiert und der Überstand wird bei +4°C oder bei -20°C gelagert bis zur weiteren Verwendung. Für ein PCR-Reaktionsvolumen von 20 µl werden 0,5-1 µl Überstand als Vorlage ("Template") eingesetzt.

Flüssige Proben

Direktes Protokoll

0,5-1 µl flüssiges Probenmaterial (z.B. Speichel, Amnionflüssigkeit) wird in eine PCR-Reaktion eines Gesamtvolumens von 50 µl überführt. Anschließend wird die direkte PCR durchgeführt (siehe Protokoll auf der folgenden Seite).

Nach der PCR wird 1,5 µl Lysis-Enhancer zu 50 µl PCR-Reaktionsvolumen zugefügt, für 5 Minuten inkubiert und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit, um evtl. vorhandene, unlösliche Reste des Probenmaterials abzutrennen.

Extrakt-Protokoll

5 µl der flüssigen Probe wird mit 20 µl Dilution Buffer (Verdünnungspuffer) und 0,5 µl Lysis-Enhancer vermischt. Der Mix wird auf einem Vortex kurz geschüttelt und anschließend abzentrifugiert. Das Lysat wird für 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend für 5 Minuten bei 98°C inkubiert. Anschließend wird das Lysat erneut herunter zentrifugiert und der Überstand wird bei +4°C oder bei -20°C gelagert bis zur weiteren Verwendung. Für ein PCR-Reaktionsvolumen von 20 µl werden 0,5-1 µl Überstand als Vorlage ("Template") eingesetzt.



Direct Tissue PCR Kit PCR PROTOKOLL (2)

Vorbereitung der PCR Reaktion mit Vollblut:

Komponente	Volumen je 20 µl Reaktion	Volumen je 50 µl Reaktion	Endkonzentration
2 x Tissue PCR Master Mix	10 µl	25 µl	1x ,0 mM MgCl ₂
Primer A	Variabel	Variabel	0.5 µM
Primer B	Variabel	Variabel	0.5 µM
Tissue DNA Polymerase	0.4 µl	1.0 µl	
Gewebeprobe		Gewebeprobe	
Direktes Proto. Extrakt-Proto.	- 0.5-1 µl	fest: 0,35-0,5 mm flüssig: 2.5 µl	
H ₂ O, DNA und DNase frei	Auf 20 µl	Auf 50 µl	
Gesamtes Volumen	20 µl	50 µl	

Hinweise:

- Puffer mischen:** Um lokale Unterschiede in der Salzkonzentration zu vermeiden, sollten alle Bestandteile der PCR Reaktion vollständig aufgetaut und vor Benutzung gründlich gemischt werden, z.B. durch Vortexen.
- Ansatz bei Raumtemperatur:** Die Reaktionen können bei Raumtemperatur zusammengefügt werden. Es ist nicht erforderlich, den Zyklus (das PCR-Gerät) vorzuheizen. Die Reaktionen können bei Raumtemperatur in den Zyklus überführt werden.
- Integrierter farbiger Ladepuffer:** Bei Verwendung des Direct Tissue PCR Kits können PCR-Reaktionen ohne nachträglichen Zusatz eines Auftragspuffers auf ein Gel geladen werden. Dem Enzymmix sind zwei inerte Farbstoffe beigegefügt (rot und gelb), die sich während der Elektrophorese auftrennen. Bezogen auf ein 1% (w/v) Agarosegel migriert der rote Farbstoff etwa auf der Höhe eines 600 bp DNA Fragmentes, der gelbe Farbstoff wandert schneller als 20 bp und markiert somit die Front des Gels. Die meisten nachfolgenden Anwendungen werden von den Farbstoffen nicht beeinträchtigt (Ausnahme: Fluoreszenz-Methoden). Trotzdem lautet die Empfehlung, PCR Produkte vor nachfolgenden enzymatischen Reaktionen aufzureinigen.
- Additiva und PCR-Optimierungen:** In der Regel ist eine Zugabe von Additiva zur PCR-Optimierung nicht erforderlich. Für einige, schwierig zu vervielfältigende PCR-Vorlagen können weitere Optimierungen notwendig werden. Das betrifft z.B. GC-reiche Sequenzabschnitte und Sequenzen mit komplexen Sekundärstrukturen. Zugabe von Additiven, beispielsweise DMSO (Startkonzentration, wenn benötigt: 3 % (v/v)) kann, vorlagenabhängig, die Amplifikation unterstützen.

Reaktionsbedingungen (PCR-Programm):

Schritt	2-Schritt Protokoll		3-Schritt Protokoll		Anzahl der Zklen
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98°C	10 min	98°C	10 min	1
Denaturierung	98°C	5-10 s	98°C	5-10 s	35-40
Annealing	-		X°C	15-30 s	
Extension	72°C	30 s / 1 kb	72°C	30 s / 1 kb	
Finale Extension	72°C	1 min	72°C	1 min	1
Kühlschritt	4°C	Unbegrenzt	4°C	Unbegrenzt	1

Hinweise:

- Zellysis:** Ein siebenminütiger einleitender Denaturierungsschritt bei 98°C bewirkt die Lysis von Zellen und aktiviert die "Hot Start" Tissue DNA Polymerase.
- Primerbindung:** Tissue DNA Polymerase stabilisiert die Hybridisierung zwischen Primer und DNA-Vorlage (template). Infolgedessen sind die Schmelztemperaturen (T_m) und die optimalen Primerbindungstemperaturen (annealing) meist signifikant höher als die entsprechenden Temperaturen für Standard DNA Polymerasen. Die Schmelztemperaturen sollten nach der sog. base-stacking (bzw. nearest neighbor) Methode berechnet werden. Ein entsprechender Online-Rechner steht auf der Roboklon-Webseite bereit (<http://www.roboklon.de/eurx/bloodpcr>). Die Standard-Parameter sind: Primerkonzentration 500 nM, Salzkonzentration 50 mM, 1.5 mM Mg²⁺ - Konzentration. Grundsätzlich gilt: Für Primer sollte eine Anlagerungs- (Annealing-) Temperatur bei der Schmelztemperatur des niedrigstschmelzenden Primers gewählt werden. Für Primer entspricht die Anlagerungstemperatur genau der Schmelztemperatur des niedrigstschmelzenden Primers. In einigen Fällen kann allerdings die optimale Anlagerungstemperatur von diesen Faustregeln abweichen. Hier muss die optimale Annealing-Temperatur empirisch bestimmt werden.
- Zweistufiges Protokoll:** Ein zweistufiges Protokoll erlaubt es, den Annealing- und Extensionsschritt bei einer Temperatur von 72°C zu kombinieren und somit den Zeitaufwand für eine PCR-Reaktion zu verkürzen. Zweistufige Protokolle empfehlen sich, wenn die T_m der Primer wenigstens 72°C beträgt.
- Extension:** Die empfohlene Extensionszeit beträgt 30 Sekunden je 1 kb Amplikon-Länge.