



# Probe Multiplex OneStep RT-qPCR Kit



## Beschreibung:

Der Kit besteht aus:

- dem Probe *Enzyme Mix* mit einer speziell optimierten Reversen Transkriptase, einer "HotStart" DNA Polymerase (chemisch inhibiert) sowie RNase Inhibitor;
- dem *RT-qPCR 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:

### Probe 1-Tube RT-qPCR Master Mix (2x)

Komponente	Artikel Nr. E0819-01	Artikel Nr. E0819-02
	25 Reaktionen, je 25 µl, 625 µl [1x] Endvolumen	100 Reaktionen, je 25 µl, 2,5 ml [1x] Endvolumen
[4x] Puffer Mix	1 x 650 µl	5 x 650 µl
Enzym-Mix	100 µl	500 µl
Wasser, nukleasefrei	1500 µl	5 x 1500 µl

### Probe 1-Tube RT-qPCR Master Mix (2x) plus ROX Solution

Komponente	Artikel Nr. E0819-03	Artikel Nr. E0819-04
	25 Reaktionen, je 25 µl, 625 µl [1x] Endvolumen	100 Reaktionen, je 25 µl, 2,5 ml [1x] Endvolumen
ROX Lösung, 25 µM	15 µl	60 µl
[4x] Puffer-Mix *	1 x 650 µl	5 x 650 µl
Enzym-Mix	100 µl	500 µl
Wasser, nukleasefrei	1500 µl	5 x 1500 µl

## Lagerung:

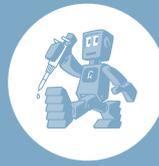
Lagerung bei -20°C im Dunklen.

\* Wiederholtes Gefrieren und Auftauen des Puffer-Mixes (mehr als vier Mal) bitte vermeiden, da hierdurch die Sensitivität des Assays beeinträchtigt wird. Falls nur unregelmäßig benötigt, diese Komponente bitte in geeignete Aliquots aufteilen und einfrieren.

Der Probe Multiplex 1-Tube RT-qPCR Kit ermöglicht präzise und sensitive qPCR-Quantifizierungen mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonden 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 TiTaq DNA Polymerase ("Hot Start" mittels reversibler, thermoabhängiger Inhibition).

## Eigenschaften:

- [4x] Puffer-Mix ist kompatibel mit marktüblichen qPCR-Zyklern. Der Mix ist optimiert für Multiplex-Assays mit sequenzspezifischen Sonden ("Probe"). RT-Reaktion und PCR-Reaktion werden in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt.
- Der Enzym-Mix enthält eine speziell angepasste, hochsensitive Reverse Transkriptase, "Hot Start" TiTaq DNA Polymerase und Ribonuklease Inhibitor.
- Die Reverse Transkriptase arbeitet in einem breiten Temperaturspektrum zwischen 35°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.
- TiTaq DNA Polymerase ist eine "HotStart" DNA Polymerase und besteht aus rekombinant hergestellter Taq DNA Polymerase. Die Aktivität der TiTaq DNA Polymerase wird durch einen thermal abhängigen Inhibitor bei Raumtemperatur reversibel inhibiert. Damit wird die Bildung unerwünschter Artefakte wie Primer-Dimere minimiert. Primer-Dimere sind unerwünschte Nebenprodukte von Primerextensionen, verursacht durch unspezifische Primer-Primer-Bindung (Annealing) bei Temperaturen kleiner als 50°C. Die Replikationsaktivität der Taq DNA Polymerase ist bei Umgebungstemperatur durch den thermal abhängigen Inhibitor blockiert. TiTaq DNA Polymerase verbleibt inaktiv, mindestens bis zum Erreichen von ausreichend hohen Temperaturen, die unspezifische Primer-Primer-Wechselwirkungen thermisch verhindern. Während des initialen Denaturierungsschrittes verliert der Inhibitor reversibel seine Wirkung.
- dNTPs sind in dem [4x] Puffer-Mix enthalten.
- 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 Probe Multiplex 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.
- Das Kit wurde auch im Hinblick auf möglichst kurze qPCR-Laufzeiten optimiert und ist für Hochdurchsatz ("High Throughput") geeignet.



# 1-Step Probe RT-qPCR Kit

## REAL TIME RT-qPCR 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	0,5 µl	500 nM
Applied Biosystems: 7500, ViiA 7  Stratagene: Mx3000P, Mx4000	0,5 µl 10 x verdünnt (in Wasser)	50 nM
Weitere Echtzeit-PCR-Geräte:  Bio-Rad, Roche, Corbett, Eppendorf, Cepheid, etc.	Nicht benötigt	-

#### Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
[4x] Puffer-Mix	6.5 µl	1 x 4 mM MgCl <sub>2</sub>
5'-Primer (Vorwärts)	Variabel	0,2-0,4 µM
3'-Primer (Revers)	Variabel	0,2-0,4 µM
Sonde (Probe)	Variabel	0,1-0,2 µM
Optional: ROX Lösung, 25 µM	0.5 µl oder 0.5 µl 10 x verdünnt	500 nM 50 nM
Enzym-Mix (als letzte Komponente zum Reaktions-Mastermix zufügen)	1 µl	1 µl pro Reaktion
Vorlagen-RNA	Variabel	1 pg - 500 ng
Wasser, nukleasefrei	Auf 25 µl	-
Endvolumen	25 µl	-

### Hinweise zur Durchführung des RT-qPCR Protokolls:

- Lagerung.** Probe Enzyme Mix, fluoreszenzmarkierte Sonden 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 [4x] Puffer-Mix 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.** [4x] Puffer-Mix sollte vor Gebrauch vollständig aufgetaut und vorsichtig durch Pipettieren gemischt 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 Sonden ist 70 - 150 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 35°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.
- MgCl<sub>2</sub>.** Die Standardkonzentration von MgCl<sub>2</sub> in Echtzeit- RT-qPCR-Reaktionen ist 4 mM (wie in 1 x konzentriertem Puffer-Mix enthalten) - für die meisten PCR Reaktionen optimal. Wenn höhere MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen benötigt werden, sollte eine 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung hergestellt werden (kann bei Bestellung bei uns angefordert werden). 1 µl einer 25 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung fügt 25 nmol zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration einer 25 µl- Reaktion um 1.0 mM.
- Primerkonzentration.** Die empfohlene Anfangskonzentration je Primer beträgt 0,4 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.
- Schmelztemperaturen.** Die optimale Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der Primer sollte etwa 60°C betragen. Die T<sub>m</sub> der fluoreszenzmarkierten Sonden sollte ca. 8 - 10 °C über der T<sub>m</sub> der Primer liegen.
- Probendesign.** Am 5'-Ende der fluoreszenzmarkierten Sonde sollte sich kein G befinden, um ein "Quenching" des Fluoreszenzsignales zu vermeiden.
- Adjustieren des Schwellenwertes.** Der Detektionsschwellenwert ("threshold value") sollte vor jedem RT-qPCR Lauf neu adjustiert werden.



# 1-Step Probe RT-qPCR Kit

## REALTIME RT-qPCR PROTOKOLL (2)

### Programm für das Echtzeit-PCR-Gerät:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Reverse Transkription	50°C	15 min	1
Einleitende Denaturatierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	10 s	40-45
Primer-Bindung, Verlängerung, Datenerfassung	60°C	40-60 s	
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

### 1. 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.