MANUFACTURED BY EURx®

MINDESTENS 12 MONATE HALTBAR
BEST USE WITHIN 12 MONTHS

roboklon

FAST
SG qPCR Master Mix (2x) + ROX
REAL TIME PCR KIT

Kit-Komponenten:

Fast SG qPCR Master Mix (2x) plus ROX Solution

Komponente	**Artikel Nr. E0412-01** 100 Reaktionen, je 25 µl, 2.5 ml (1x) Endvolumen	**Artikel Nr. E0412-02** 200 Reaktionen, je 25 µl, 5 ml (1x) Endvolumen	**Artikel Nr. E0412-03** 1.000 Reakt., je 25 µl, 25 ml (1x) Endvolumen
Fast SG 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 4°C im Dunklen. Die Haltbarkeit bei +4°C beträgt mindestens 9 Monate. Der Master Mix darf nicht eingefroren werden.

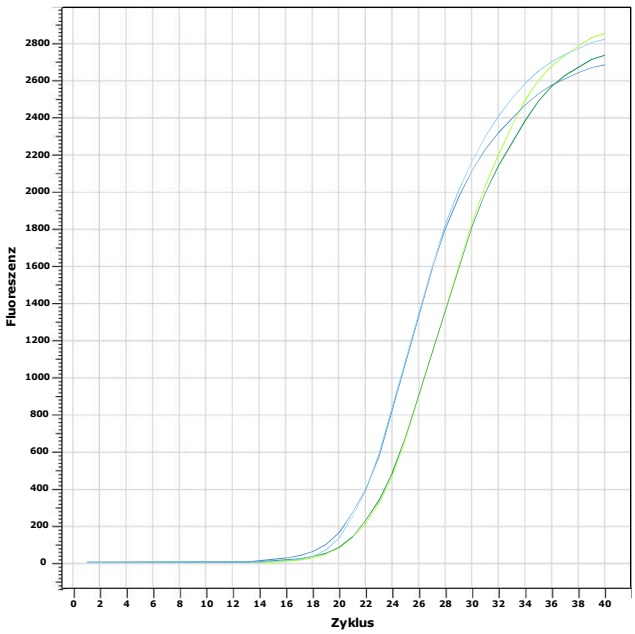

Abbildung 1: Unter Fast-PCR Bedingungen unterscheiden sich FAST SG qPCR Master Mix und "Standard" SG qPCR Master Mix um mehr als einen Ct-Wert.
PCR-Bedingungen: 45°C 120s (UNG Schritt) - 95°C 180 s - 45 x (96°C 5 s, 64°C 10 s, 72°C 20 s). Ct-Werte: Fast SG qPCR Master Mix 20.41 und 20.65, "Standard" SG qPCR Master Mix: 21.73 und 21.89.

Beschreibung:

- Optimiert für 2-stufige und für 3-stufige qPCR-Protokolle.
- Der Fast SG 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, dNTPs (dTTP ist teilweise durch dUTP ersetzt) und SYBR Green I – Fluoreszenzfarbstoff.
- SYBR Green I ermöglicht es, quantitative PCR-Analysen durchzuführen, ohne teuere, sequenzspezifisch markierte Proben einzusetzen.
- 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. Solange die Polymerase bei Raumtemperatur inaktiviert bleibt, wird die nicht erwünschte Ausbildung von Primer-Dimeren durch unspezifische Wechselwirkungen ("Annealing") während der Reaktionsvorbereitung verhindert. Die Spezifität und Sensitivität der PCR-Reaktion wird erhöht. Quantitative PCR-Messungen werden nicht durch unerwünschte Amplifikation von Primer-Dimeren verfälscht.
- HotStart Perpetual *Taq* DNA Polymerase ermöglicht komfortables Zusammenfügen der Reaktion bei Raumtemperatur.
- Der Fluorszenzfarbstoff SYBR Green I bindet spezifisch an doppelsträngige DNA-Moleküle und emittiert daraufhin ein Fluoreszenzsignal. Die Messung der Fluoreszenz wird bei Wellenlängen von 494 nm (Anregung) und 521 nm (Emission) durchgeführt und ist kompatibel mit den meisten gängigen Echtzeit-PCR-Automaten.
- Fast SG qPCR Master Mix (2x) enthält dUTP als partiellen Ersatz für dTTP. Uracil-N-Glycosylase (UNG) kann optional zugefügt, um Kontaminationen durch Verschleppung zwischen verschiedenen Reaktionsansätzen entgegenzuwirken. UNG entfernt Uracil von beliebigen dU-enthaltenden, 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 Fast SG 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, hat ein anderes Emmisionsspektrum als SYBR Green I 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).

ROBOKLON GMBH | ROBERT-RÖSSLE-STR.10 B55 | D-13125 BERLIN | GERMANY
FAX 030 / 310 19 19 7 | FON 030 / 318 09 37 2 | WWW.ROBOKLON.DE
HERGESTELLT VON EURx Sp. z o.o. POLAND | WWW.EURX.COM.PL | MADE IN THE EU

Fast SG 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	Benötigte ROX-Menge je 25 µl Reaktion	Endgültige ROX-Konzentration
Applied Biosystems: 7300, 7900HT, StepOne, StepOnePlus, ABI PRISM 7000 und 7700	0.1 µl	10 µl	100 nM
Applied Biosystems: 7500 Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0.1 µl 10 x verdünnt (in Wasser)	10 µl 10 x verdünnt (in Wasser)	10 nM
Weitere Echtzeit-PCR-Geräte: Bio-Rad, Roche, Corbett, Eppendorf, Cepheid, etc.	Nicht benötigt	Nicht benötigt	-

Ansetzen der qPCR Reaktion:

Komponente	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
Fast SG qPCR Master Mix (2x)	12.5 µl	1 x 2 mM $MgCl_2$
5'-Primer	Variabel	0.5 µM
3'-Primer	Variabel	0.5 µM
Vorlagen-DNA	Variabel	< 500 ng
Optional: ROX Lösung, 25 µM	0.1 µl oder 0.1 µl 10 x verdünnt	100 nM 10 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:

1. **Dunkel lagern.** 25 x SG Lösung und ROX Lösung sollten vor Lichteinfluss geschützt werden um einem vorzeitigen Verlust der Fluoreszenz-Signalintensität entgegenzuwirken.
2. **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.
3. **Optimale Länge des Amplikons.** Die optimale Amplikonlänge für Echtzeit-PCR mit SYBR Green I beträgt 70 – 200 bp.
4. **Konzentrationsunterschiede vermeiden:** Vor Gebrauch alle Lösungen auftauen, schonend vortexen und kurz anzentrifugieren.
5. **Arbeiten bei Raumtemperatur:** PCR-Reaktionen werden mit dem Fast SG qPCR Master Mix (2x) komfortabel bei Raumtemperatur angesetzt.
6. **Reaktions-Mastermix:** Bei hohem Probendurchsatz kann ein Reaktions-Master Mix vorbereitet werden, der alle Komponenten bis auf Vorlagen-DNA (Template) enthält.
7. **Proben mischen:** Der Reaktions-Master Mix wird gründlich gemischt und geeignete Aliquots werden in PCR-Reaktionsgefäße oder -platten verteilt.
8. **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.
9. **Kurz anzentrifugieren**, um die Reaktionskomponenten am Gefäßboden zu sammeln und Luftblasen zu entfernen. Luftblasen beeinträchtigen die quantitative Fluoreszenzmessung empfindlich.
10. **Start.** Die Proben in das Echtzeit-PCR-Gerät stellen und das Programm zur Fluoreszenzmessung starten.
11. **$MgCl_2$:** Die Standardkonzentration von $MgCl_2$ in Echtzeit-PCR-Reaktionen ist 2 mM (wie in 1 x Fast SG qPCR Master Mix enthalten) - für die meisten PCR Reaktionen optimal. Wenn höhere $MgCl_2$ Konzentrationen benötigt werden, sollte eine 25 mM $MgCl_2$ Stammlösung hergestellt werden (kann bei Bestellung bei uns angefordert werden). 1 µl einer 25 mM $MgCl_2$-Lösung fügt 25 nmol zum Reaktionsansatz zu und erhöht damit die $MgCl_2$-Konzentration einer 25 µl Reaktion um 1.0 mM.
12. **Die empfohlene Anfangskonzentration je Primer** beträgt 0.5 µM. Wird die Primerkonzentration erhöht, kann die PCR-Effizienz steigen, aber die Spezifität der PCR-Reaktion nimmt ab. Die optimale Primerkonzentration hängt sowohl von der einzelnen Reaktion als auch vom verwendeten Echtzeit-PCR-Gerät ab. Bei Ausbildung unspezifischer PCR-Produkte sollte die Primerkonzentration auf 0.3 µM herabgesetzt werden.
13. **Einstellen des Schwellenwertes:** Der Schwellenwert (threshold value) für die Analyse soll vor jeder Messung eingestellt werden.
14. **Gefäß-Korrekturfaktor bestimmen.** Wird eines der Instrumente, Bio-Rad iCycler iQ oder MyiQ, eingesetzt, sollte am Anfang der Messung ein Gefäß-Korrekturfaktor ("well factor") bestimmt werden. Gefäßfaktoren dienen zur Korrektur für Variationen bei Fluoreszenzanregung oder zur Korrektur von Pipettierungenauigkeiten. Zur Bestimmung wird eine spezielle, externe "well factor" - Platte gemäß der Empfehlungen des Herstellers eingesetzt.

Fast SG qPCR Master Mix (2x)

REALTIME PCR PROTOKOLL (2)

qPCR- Protokoll - Echtzeit-PCR-Bedingungen

Programm für das Echtzeit-PCR-Gerät:

2-stufiges qPCR Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Optional: Thermolabile UNG-Vorbehandlung	37°C	2 min	1
Einleitende De-naturatierung	95°C	2-5 min	1
Denaturierung Primer-Bindung	95°C 60°C	10 s 30 s	35-45
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

3-stufiges qPCR Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Optional: Thermolabile UNG-Vorbehandlung	37°C	2 min	1
Einleitende De-naturatierung	95°C	2-5 min	1
Denaturierung Primer-Bindung Verlängerung	95°C 50-65°C 72°C	10 s 10 s 15 s	35-45
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

Hinweise:

1. **2-stufiges Protokoll für schnelle qPCR:** Fast SG qPCR Master Mix wurde für die Verwendung mit einem 2-stufigen PCR-Protokoll entwickelt und optimiert. Dieses Protokoll eignet sich für die Verwendung mit den meisten Primern, auch wenn der nominale T_m deutlich unterhalb 60°C liegt.
2. **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.
3. **Einleitende Denaturierung:** Während des einleitenden Denaturierungsschrittes werden sowohl thermolabile 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.
4. **Qualitätskontrolle - Schmelzkurvenanalye:** Die Schmelzkurve sollte analysiert werden, um Spezifität und Identität des PCR-Produktes zu verifizieren. Entsprechende, leistungsfähige Routinen zur Schmelzkurvenanalyse sind Bestandteile der Programmausrüstung gängiger Echtzeit-PCR-Geräte. Als Grundlage sollten die Daten für einen Temperaturbereich zwischen 65°C und 95°C herangezogen werden.
5. **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.