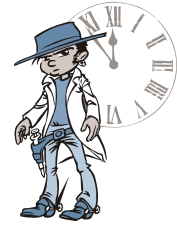


FAST Probe qPCR Master Mix (2x) + ROX REAL TIME PCR KIT FÜR MARKIERTE SONDEN



Kit-Komponenten:

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

Komponente	Artikel Nr. E0423-01	Artikel Nr. E0423-02	Artikel Nr. E0423-03
	100 Reaktionen, je 25 µl, 2,5 ml [1x] Endvolumen	200 Reaktionen, je 25 µl, 5 ml [1x] Endvolumen	1.000 Reakt., je 25 µl, 25 ml [1x] Endvolumen
Fast 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° oder bei 4°C für bis zu 1 Monat.

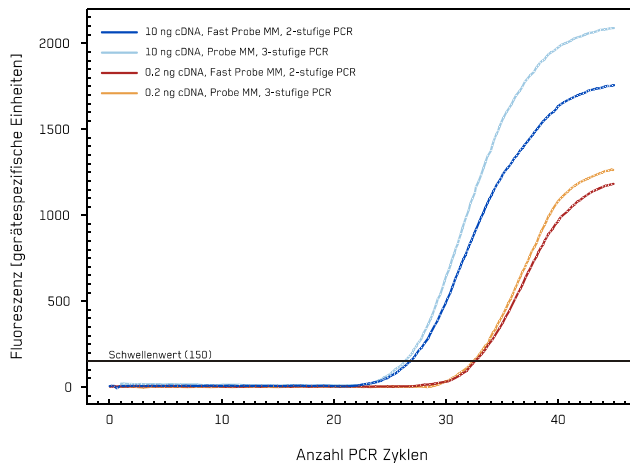
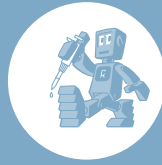


Abbildung 1: Vergleichende sondenbasierte qPCR zwischen EURx Probe qPCR Master Mix (2x) und Fast Probe qPCR Master Mix (2x). Fast Probe qPCR Reaktionen wurden mit einem Geschwindigkeits- und Durchsatz-optimierten, zweistufigen qPCR Protokoll durchgeführt. Standard Probe qPCR Reaktionen wurden mit einem konventionellen, dreistufigen qPCR Protokoll durchgeführt. Die sondenbasierte qPCR basiert auf TUBB (Beta-Tubulin)-spezifischen Primern und einer mittels FAM fluoreszenzmarkierten Sonde. Alle Reaktionen wurden in Duplikaten durchgeführt. In der Abbildung ist jeweils eine der nahezu identischen Amplifikationskurven entsprechender Duplikate dargestellt. Als Vorlagen-DNA diente cDNA (10 ng oder 0.2 ng), dargestellt aus RNA von humanen Leukozyten. Die CT Werte entsprechender Reaktionen unterschieden sich um maximal 0.5 zwischen dem konventionellen 3-schrittigen und dem Durchsatz-optimierten 2-schrittigen Protokoll. In allen Fällen betrug die PCR Effizienz rund 90%.

Beschreibung:

- Optimiert für 2-stufige und für 3-stufige qPCR-Protokolle.
- Der Fast 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. 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.
- Fast Probe qPCR Master Mix (2x) enthält dUTP als partiellen Ersatz für dTTP. Thermolabile 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 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).



Fast Probe qPCR Master Mix (2x)

REAL TIME PCR PROTOKOLL (1)

qPCR- Protokoll

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

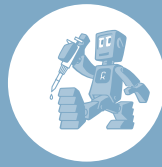
Instrument	Benötigte ROX-Menge je 25 µl Reaktion	Endgültige ROX-Konzentration
Applied Biosystems: 7300, 7900HT, StepOne, StepOnePlus, ABI PRISM 7000 und 7700	0.3-0.5 µl	300-500 nM
Applied Biosystems: 7500 Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0.3-0.5 µl 10 x verdünnt (in Wasser)	30-50 nM
Weitere Echtzeit-PCR-Geräte: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

Ansetzen der qPCR Reaktion:

Komponente	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
Fast 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: 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.
- Optimale Länge des Amplikons.** Die optimale Amplikonlänge für Echtzeit-PCR auf Basis molekularer Proben beträgt 70 – 150 bp.
- Konzentrationsunterschiede vermeiden.** Vor Gebrauch alle Lösungen auftauen, schonend vortexen und kurz an zentrifugieren.
- Arbeiten bei Raumtemperatur.** PCR-Reaktionen werden mit dem Fast 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.
- Reaktionsansätze mischen.** 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.
- 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 Fast 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 (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.
- Einstellen des Schwellenwertes:** Der Schwellenwert (threshold value) für die Analyse soll vor jeder Messung eingestellt werden.



Fast Probe qPCR Master Mix (2x)

REALTIME PCR PROTOKOLL (2)

qPCR- Protokoll - Echtzeit-PCR-Bedingungen

Programm für das Echtzeit-PCR-Gerät:

2-stufiges Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Optional: UNG- Vorbehandlung	37°C	2 min	1
Einleitende De- naturatierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	5-10 s	35-45
Primer-Bindung / Verlängerung	60°C	30 s	
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

3-stufiges Protokoll

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Optional: UNG- Vorbehandlung	37°C	2 min	1
Einleitende De- naturatierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	5-10 s	35-45
Primer-Bindung	50-60°C	10 s	
Verlängerung	72°C	15 s	
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

Hinweise:

- 2-stufiges Protokoll für schnelle qPCR.** Fast Probe 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.
- 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-enhaltende, 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 - 5 min bei 95°C inkubiert.
- 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.