

## SG onTaq qPCR Master Mix (2x)

### Kit-Komponenten:

#### SG onTaq qPCR Master Mix (2x)

Komponente	Artikel Nr. E0405-01 100 Reaktionen, je 25 µl, 2.5 ml [1x] Endvolumen	Artikel Nr. E0405-02 200 Reaktionen, je 25 µl, 5 ml [1x] Endvolumen	Artikel Nr. E0405-03 1000 Reakt. je 25 µl, 25 ml [1x] Endvolumen
SG onTaq qPCR Master Mix (2x)	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

#### SG onTaq qPCR Master Mix plus ROX Solution (2x)

Komponente	Artikel Nr. E0406-01 100 Reaktionen, je 25 µl, 2.5 ml [1x] Endvolumen	Artikel Nr. E0406-02 200 Reaktionen, je 25 µl, 5 ml [1x] Endvolumen	Artikel Nr. E0406-03 1000 Reakt. je 25 µl, 25 ml [1x] Endvolumen
SG onTaq qPCR Master Mix (2x)	1 x 1.25 ml	2 x 1.25 ml	10 x 1.25 ml
ROX Solution (25 mM)	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

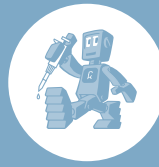
#### SG/ROX onTaq qPCR Master Mix (2x)

Komponente	Artikel Nr. E0407-01 100 Reaktionen, je 25 µl, 2.5 ml [1x] Endvolumen	Artikel Nr. E0407-02 200 Reaktionen, je 25 µl, 5 ml [1x] Endvolumen	Artikel Nr. E0407-03 1000 Reakt. je 25 µl, 25 ml [1x] Endvolumen
SG/ROX onTaq qPCR Master Mix (2x)	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.

### Beschreibung:

- Der SG onTaq 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 onTaq 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 teure, sequenzspezifisch markierte Proben einzusetzen.
- onTaq DNA Polymerase ist ein modifiziertes "HotStart" Enzym, das bei moderaten Temperaturen durch chemische Inhibition blockiert ist. Die Polymerase-Aktivität wird durch einen initialen Denaturierungsschritt bei 95°C irreversibel wieder hergestellt.
- Wird die Reaktion bei Raumtemperatur zusammengefügt, ist das "Hot Start" Enzym inaktiv. Das verhindert eine unerwünschte Kettenverlängerung (Extension) von unspezifisch bindenden Oligonukleotiden und von Primer-Primer-Dimeren während der Dauer des Ansatzens der Reaktionen. Damit ermöglicht "HotStart" onTaq DNA Polymerase das komfortable Zusammenfügen der Reaktionen bei Raumtemperatur.
- Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I bindet spezifisch an doppelsträngige DNA-Moleküle und emittiert daraufhin ein Fluoreszenzsignal. Die Messung wird bei Wellenlängen von 494 nm (Anregung) und 521 nm (Emission) durchgeführt und ist kompatibel mit den meisten gängigen Echtzeit-PCR-Automaten.
- SG onTaq qPCR Master Mix (2x) 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 SG onTaq qPCR Master Mix (2x) wird in drei Varianten angeboten: Ohne ROX (E0405), mit ROX Lösung in einem separaten Gefäß beiliegend (E0406) und mit bereits vorgelegtem ROX im Master Mix (E0407). 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 geringerer, PCR-unabhängiger Variationen. ROX beeinflusst die PCR-Reaktion nicht, hat ein anderes Emissionsspektrum 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).



# SG onTaq qPCR Master Mix (2x)

## REAL TIME PCR PROTOKOLL (1)

### qPCR- Protokoll

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

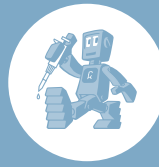
Instrument	Benötigte ROX-Menge je 25 µl Reaktion	Endgültige ROX-Konzentration
Applied Biosystems: 7300, 7900HT, StepOne, StepOnePlus, ABI PRISM 7000 und 7700	0,5 µl	500 nM
Applied Biosystems: 7500 Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	0,5 µl 10 x verdünnt (in Wasser)	50 nM
Weitere Echtzeit-PCR-Geräte:  Bio-Rad, Roche, Corbett, Eppendorf, Cepheid, etc.	Nicht benötigt	-

#### Ansetzen der PCR Reaktion:

Komponente	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
SG onTaq qPCR Master Mix (2x) oder SG/ROX onTaq qPCR Master Mix (2x)	12,5 µl	1 x 2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
5'-Primer	Variabel	0,3 - 0,5 µM
3'-Primer	Variabel	0,3 - 0,5 µM
Vorlagen-DNA	Variabel	<500 ng
Optional (nur Best.Nr. E0406): ROX Lösung, 25 µM	0,5 µl oder 0,5 µl 10 x verdünnt	500 nM 50 nM
Optional: UNG (Uracil-N-Glycosylase) 1 U/µl	0,25 µl	0,25 U / Reaktion
Wasser, nukleasefrei	Auf 25 µl	-
Endvolumen	25 µl	-

### Hinweise:

1. SG onTaq qPCR Master Mix (2x) und ROX Lösung sollten vor Lichteinfluss geschützt werden um einem vorzeitigen Verlust der Fluoreszenz-Signalintensität entgegenzuwirken.
2. Das empfohlene Reaktionsvolumen für die meisten Echtzeit-PCR-Geräte beträgt 25 µl. Andere Volumina können verwendet werden, wenn für ein spezifisches Gerät empfohlen.
3. Die optimale Amplikonlänge für Echtzeit-PCR mit SYBR GreenI beträgt 70 - 200 bp.
4. Vor Gebrauch alle Lösungen auftauen, schonend vortexen und kurz anzentrifugieren.
5. PCR-Reaktionen werden mit dem SG onTaq qPCR Master Mix (2x) komfortabel bei Raumtemperatur angesetzt.
6. Bei hohem Probanddurchsatz kann ein Reaktions-Master Mix vorbereitet werden, der alle Komponenten bis auf Vorlagen-DNA (Template) enthält.
7. Der Reaktions-Master Mix wird gründlich gemischt und geeignete Aliquots werden in PCR-Reaktionsgefäße oder -platten verteilt.
8. 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. Die Proben werden in das Echtzeit-PCR-Gerät gestellt und das Programm zur Fluoreszenzmessung gestartet.
11. Die Standardkonzentration von MgCl<sub>2</sub> in Echtzeit-PCR-Reaktionen ist 2.5 mM (wie in 1 x SG onTaq qPCR Master 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.
12. Eine Primerkonzentration von 0.3 - 0.5 µM ist in den meisten Fällen optimal, kann aber für spezielle Reaktionen in einem Konzentrationsbereich von 0.1 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.
13. Der Schwellenwert (threshold value) für die Analyse soll vor jeder Messung eingestellt werden.
14. Wird eines der Instrumente, Bio-Rad iCycler iQ oder MyiQ, eingesetzt, sollte am Anfang der Messung ein Gefäßfaktor ("well factor") bestimmt werden. Gefäßfaktoren dienen zur Korrektur für Variationen bei Fluoreszenzanregung oder für Pipettiergenauigkeiten. Zur Bestimmung wird eine spezielle, externe "well factor" - Platte gemäß der Empfehlungen des Herstellers eingesetzt.



# SG onTaq qPCR Master Mix (2x)

## REALTIME PCR PROTOKOLL (2)

### qPCR- Protokoll - Echtzeit-PCR-Bedingungen

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

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
Optional: UNG- Vorbehandlung	50°C	2 min	1
Einleitende Denaturatierung	95°C	15 min	1
Denaturierung	94°C	15 s	35-45
Primer-Bindung	50-60°C	30 s	
Verlängerung	72°C	30 s	
Optional: Datenerfassung	X°C	15 s	
Kühlschritt	4°C	Unbestimmt	1

#### Hinweise:

1. Wird Uracil-N-Glycosylase (UNG) optional eingesetzt, muss ein Inkubationsschritt bei 50°C für zwei Minuten durchgeführt werden. UNG baut dUMP-enthaltende, kontaminierende PCR-Produkte ab und wirkt somit Verschleppungskontaminationen entgegen.
2. Während des einleitenden Denaturierungsschrittes wird UNG inaktiviert. Zur vollständigen Denaturierung werden die Reaktionen für 15 min bei 95°C inkubiert. onTaq DNA Polymerase benötigt zwingend 15 Minuten bei 95°C, um aktiviert zu werden und die Polymeraseaktivität vollständig wieder herzustellen.
3. Bei Temperaturen unterhalb von 55°C wird UNG-Aktivität teilweise wieder hergestellt, da sich das Protein erneut zurück faltet. Deswegen sollte die Temperatur bei allen PCR-Schritten 55°C nie unterschreiten, insbesondere bei der Primer-Bindung (dem "Annealing"). Unmittelbar nach Beendigung der PCR sollten die Reaktionen auf 4°C gekühlt werden und anschließend entweder direkt auf ein Gel aufgetragen oder in gefrorenem Zustand gelagert werden.
4. 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. Die Datenerfassung sollte während des Kettenverlängerungsschrittes ("extension") durchgeführt werden. Es besteht die Möglichkeit, verfälschende Fluoreszenzsignale aus unerwünschter Amplifikation von Primer-Dimeren zu unterdrücken, indem ein zusätzlicher Datenerfassungsschritt zum Protokoll hinzugefügt wird. Möglich ist das immer dann, wenn die Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) des Primer-Dimeres deutlich niedriger als die T<sub>m</sub> des spezifischen Produktes liegt. Die T<sub>m</sub> wird durch die Schmelzkurvenanalyse berechnet. Während der Datenerfassung sollte die Temperatur über der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) des Primer-Dimers liegen, aber etwa 3°C unterhalb der T<sub>m</sub> des spezifischen Produktes.
6. 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.