



dsGreen® lyophilisiertes qPCR-Kit  
Handbuch



## Contents

Deutsch: dsGreen® lyophilisiertes qPCR-Kit Handbuch .....	3-6
---	-----

## dsGreen® lyophilisiertes qPCR-Kit Handbuch

Das **dsGreen® lyophilisierte qPCR-Kit** wurde entwickelt, um den genauen der DNA-Matrix in der Testprobe zu bestimmen. Es ist für die Erkennung der Genkopienzahl, die Genexpressionsanalyse und die Genotypisierung mit der Real-Time-qPCR (RT-qPCR)-Methode geeignet. Das Kit enthält Hot Start (HS)-Polymerase, die eine unspezifische Amplifikation verhindert. Zur Detektion wird der interkalierende **Farbstoff dsGreen** verwendet.

dsGreen lyophilisierte qPCR-Kit-Reaktionsmischung enthält keinen ROX-Referenzfarbstoff; daher ist es mit jedem Echtzeit-DNA-Verstärker kompatibel. Ein Volumen der Reaktionsmischung von 1 ml ist genug für 100 rxn von 20 µl.

### Bestandteile

Komponente	Anzahl
	<b>32162</b> <b>100 Reaktionen</b>
31315, Lyophilisierte HS-Taq-Polymerase-Zusammensetzung, 100 rxn	1
51215, Polymerase-Rekonstitutionspuffer, 1 mL	1
11010, dsGreen für Echtzeit-PCR, 100×, 100 µL	1

Transport: bei Raumtemperatur bis zu drei Wochen. Lagerungsbedingungen: bei -20 °C.

Haltbarkeit: 12 Monate.

**Kompatibilität mit Geräten:** Kompatibel mit allen Thermocyclern.

# Protokoll

1. Lösen Sie HS Taq-Polymerase (Komponente Nr. 1) in Polymerase-Rekonstitutionspuffer (Komponente Nr. 2). Dafür fügen Sie das gesamte Volumen des Röhrchens mit Komponente Nr. 2 in das Röhrchen mit Komponente Nr. 1 hinzu. Vorsichtig resuspendieren und warten, bis es vollständig aufgelöst ist (5 Minuten).
2. Geben Sie 20  $\mu\text{l}$  dsGreen für Real-Time PCR, 100x (Komponente Nr. 3) in das Röhrchen. Mischen Sie die entstandene Mischung sorgfältig und zentrifugieren Sie die Lösung kurz.

**Wichtig!** Lagern Sie die Reaktionsmischung nach der Vorbereitung und Zugabe des dsGreen-Farbstoffs bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

3. Bereiten Sie eine Reaktionsmischung gemäß der Tabelle im Verhältnis pro (N+O,1N) Reaktionen vor, wobei N die erforderliche Anzahl von Reaktionen ist. Fügen Sie die Komponenten in der angegebenen Reihenfolge hinzu. Mischen Sie gut mit einem Wirbelschüttler und zentrifugieren Sie die Lösung kurz.

**Wichtig!** Das Volumen der Reaktionslösung kann je nach Anwendung variieren, ein Volumen von weniger als 10  $\mu\text{l}$  wird jedoch nicht empfohlen.

### Berechnungen für das Gesamtvolumen 20 $\mu\text{l}$ pro Einzelreaktion:

Bei Verwendung eines anderen Reaktionsvolumens sind die Reaktionskomponenten anteilig, wie unten angezeigt umzurechnen.

Komponente	Volumen	Notiz
2x Reaktionsgemisch	10 $\mu\text{l}$	—
Forward Primer	0,5–1,5 $\mu\text{l}$ 10 $\mu\text{M}$ Lösung	5–15 pmol/Reaktion (Endkonzentration 250–750 nM)
Reverse Primer	0,5–1,5 $\mu\text{l}$ 10 $\mu\text{M}$ Lösung	
Deionisiertes Wasser	Wird zugegeben, um das Reaktionsvolumen auf 20 $\mu\text{l}$ anfüllen	

DNA	2–9 $\mu$ l (cDNA, 50–100 ng genomische DNA, 1–100 pg Plasmid-DNA)	Wird separat in jedes Röhrchen gegeben (siehe Schritt 4)
-----	--	--

**Das Gesamtvolumen der Reaktion**

**20  $\mu$ l**

- Fügen Sie das endgültige Volumen der Reaktionsmischung ins separate PCR-Röhrchen hinzu, ohne das Volumen der DNA-Probe zu berücksichtigen. Fügen Sie jedem PCR-Röhrchen DNA-Proben hinzu und zentrifugieren Sie die Lösung kurz.

**Wichtig!** *Um zuverlässige und reproduzierbare Daten zu erhalten, führen Sie die PCR-Reaktion für jede DNA-Probe mindestens zweimal durch.*

## Amplifikationsprogramm

Verwenden Sie die Standardmethode, um den Schmelzpunkt des Primers ( $T_m$ ) mit dem Nearest-Neighbor-Algorithmus (SantaLucia J. Jr., 1998) zu berechnen. Die Primer-Annealing-Temperatur wird nach folgender Gleichung bestimmt:  $T_a = T_m - 5\text{ }^\circ\text{C}$ .

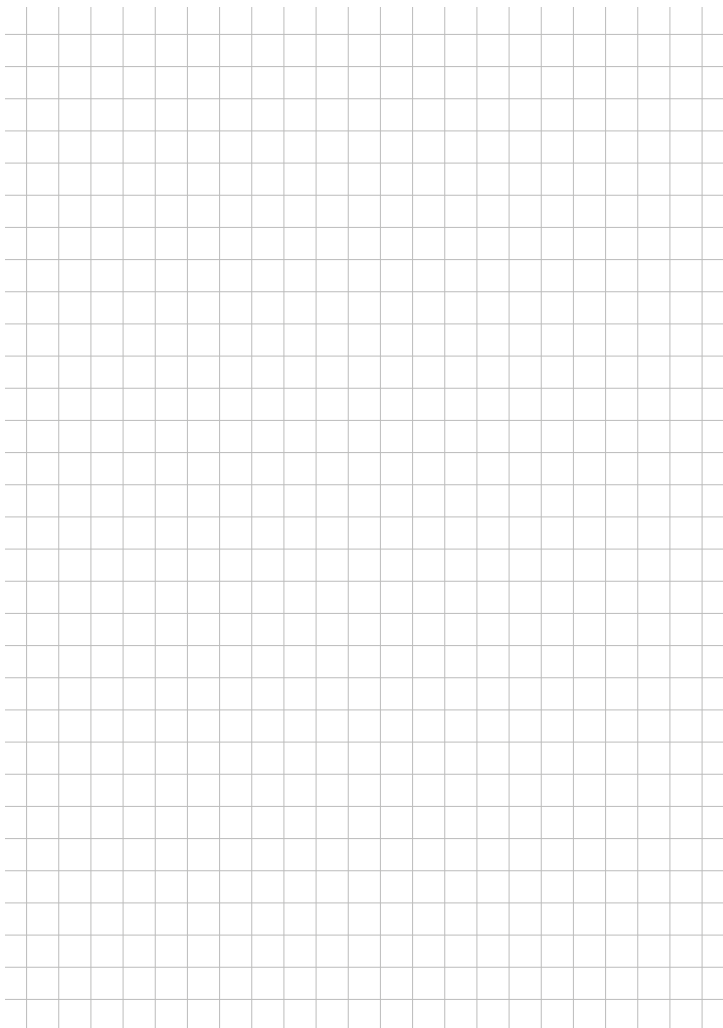
### Wenn die Annealingtemperatur der Primer $\geq 60\text{ }^\circ\text{C}$ :

Phase	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Aktivierung der HS-Taq-Polymerase	95 °C	5 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	10 Sekunden	40
Primer-Annealing kombiniert mit Elongation (zu diesem Zeitpunkt sollte eine Fluoreszenzdetektion durchgeführt werden)	60–72 °C	30–60 Sekunden	

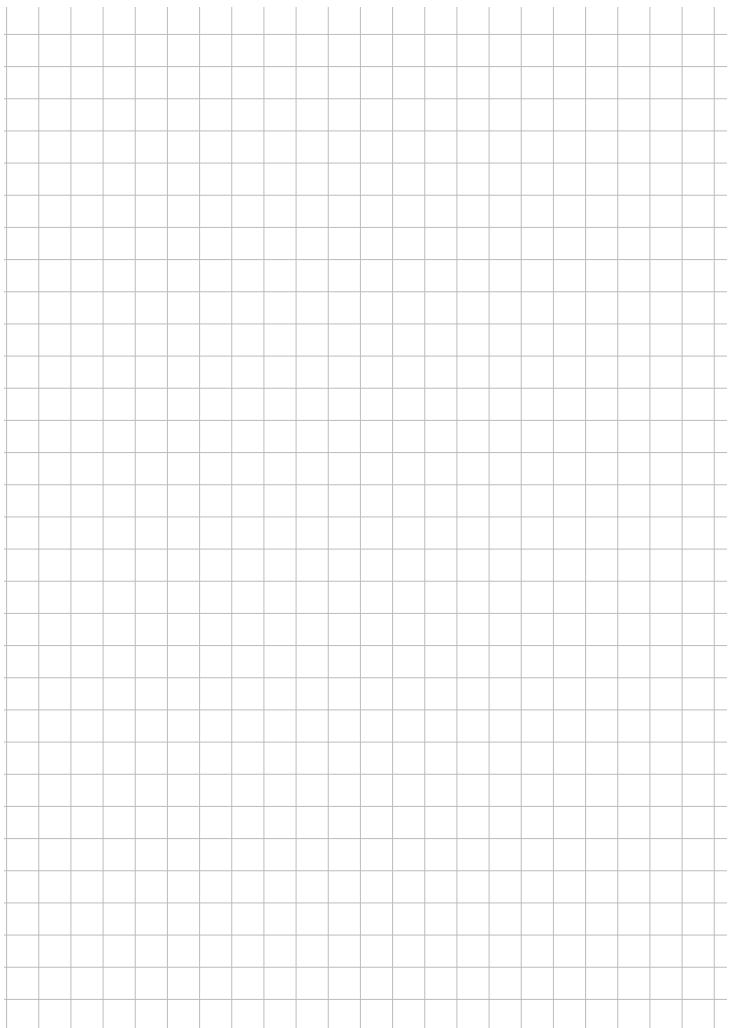
### Wenn die Annealingtemperatur der Primer $< 60\text{ }^\circ\text{C}$ :

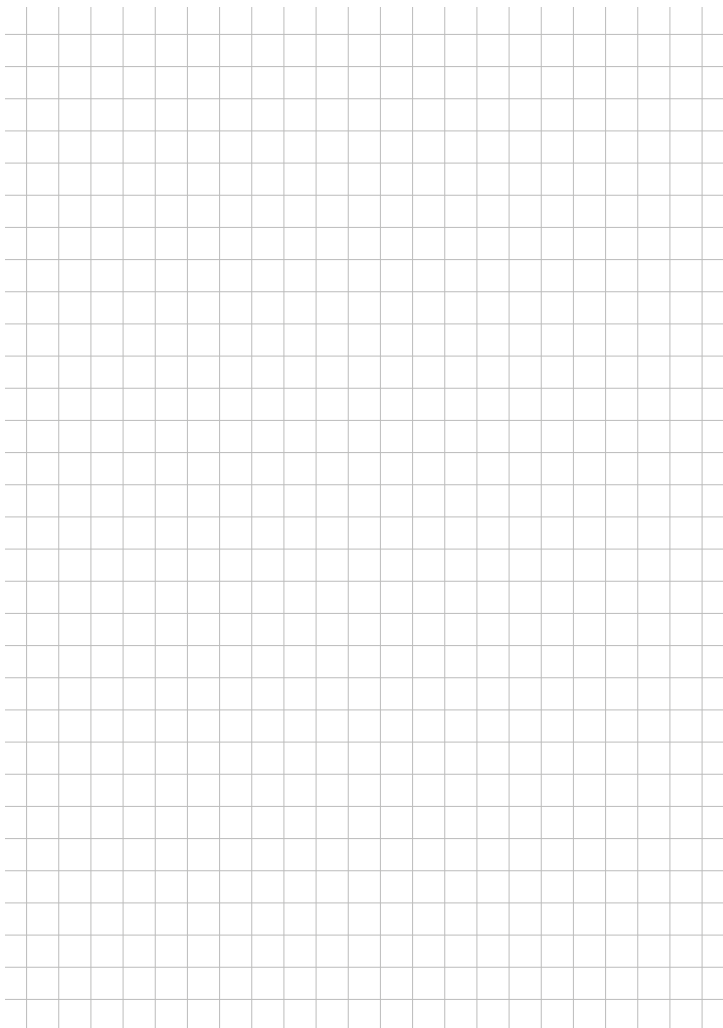
Phase	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Aktivierung der HS-Taq-Polymerase	95 °C	5 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	10 Sekunden	40
Primer-Annealing (Fluoreszenzdetektion sollte zu diesem Zeitpunkt durchgeführt werden)	55–59 °C	10–15 Sekunden	
Verlängerung	72 °C	15–30 Sekunden	

**Wichtig!** Nach der Amplifikation wird empfohlen, das Schmelzen der Amplikons in einem Bereich von 60 bis 95 °C durchzuführen, um sicherzustellen, dass keine unspezifische Amplifikation stattfindet.













22.09.509-QM  
Issued by INSPECT



[www.lumiprobe.com](http://www.lumiprobe.com)

