



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
	32162 100 Reaktionen
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 μl 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 μl wird jedoch nicht empfohlen.

Berechnungen für das Gesamtvolumen 20 μl pro Einzelreaktion:

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

Komponente	Volumen	Notiz
2x Reaktionsgemisch	10 μl	—
Forward Primer	0,5–1,5 μl 10 μM Lösung	5–15 pmol/Reaktion (Endkonzentration 250–750 nM)
Reverse Primer	0,5–1,5 μl 10 μM Lösung	
Deionisiertes Wasser	Wird zugegeben, um das Reaktionsvolumen auf 20 μl anfüllen	

DNA	2–9 μ 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 μ 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

