



Contents

Deutsch: Eva488 lyophilisiertes qPCR-Kit Handbuch	3-6
---	-----

Eva488 lyophilisiertes qPCR-Kit Handbuch

Das **Eva488 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. In dem Kit wird der interkalierende **Farbstoff Eva488-Farbstoff** (EvaGreen® -Analog) verwendet, der an doppelsträngige DNA bindet, ohne die Reaktion zu hemmen, und einen hohen Anstieg des Fluoreszenzsignals aufweist.

Eva488 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
	33162
	100 Reaktionen
31315, Lyophilisierte HS-Taq-Polymerase-Zusammensetzung, 100 rxn	1
52215, Polymerase-Rekonstitutionspuffer mit Eva488, 1 mL	1

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

Haltbarkeit: 12 Monate.

Kompatibilität mit Geräten: Kompatibel mit allen Thermocyclern.

Protokoll

- Lösen Sie HS Taq-Polymerase (Komponente Nr. 1) in Polymerase-Rekonstitutionspuffer mit Eva488 (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).

Wichtig! Lagern Sie die Reaktionsmischung nach der Vorbereitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Bereiten Sie eine Reaktionsmischung gemäß der Tabelle im Verhältnis pro $(N+0,1N)$ 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 $10\text{ }\mu\text{l}$ wird jedoch nicht empfohlen.

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

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

Komponente	Volumen	Notiz
2x Reaktionsgemisch	$10\text{ }\mu\text{l}$	—
Forward Primer	$0,5\text{--}1,5\text{ }\mu\text{l}$ $10\text{ }\mu\text{M}$ Lösung	5–15 pmol/Reaktion (Endkonzentration 250–750 nM)
Reverse Primer	$0,5\text{--}1,5\text{ }\mu\text{l}$ $10\text{ }\mu\text{M}$ Lösung	
Deionisiertes Wasser	Wird zugegeben, um das Reaktionsvolumen auf $20\text{ }\mu\text{l}$ anfüllen	
DNA	$2\text{--}9\text{ }\mu\text{l}$ (cDNA, $50\text{--}100\text{ ng}$ genomische DNA, $1\text{--}100\text{ pg}$ Plasmid-DNA)	Wird separat in jedes Röhrchen gegeben (siehe Schritt 3)
Das Gesamtvolumen der Reaktion	$20\text{ }\mu\text{l}$	

3. 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: $T_a = T_m - 5\text{ °C}$.

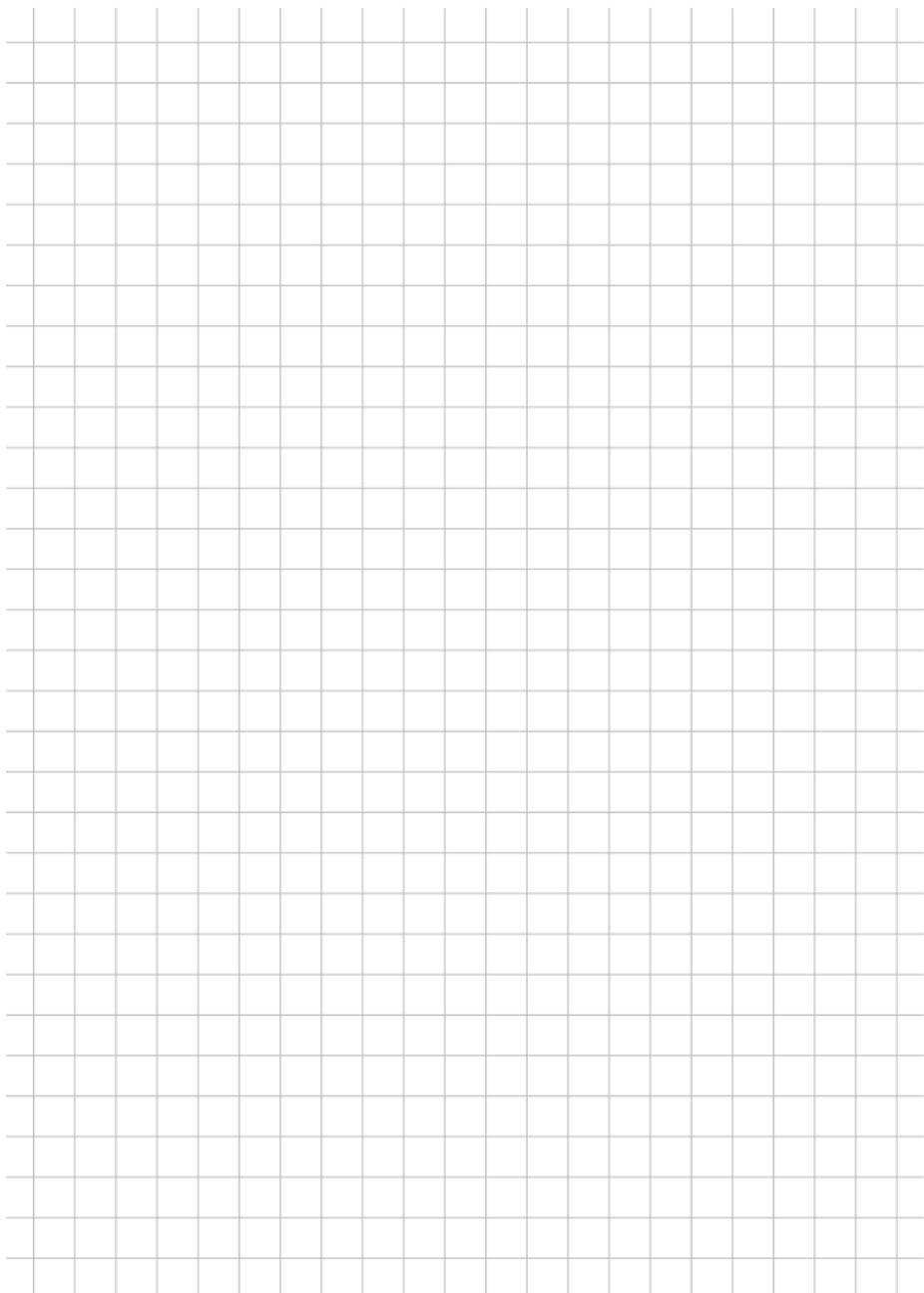
Wenn die Annealingtemperatur der Primer $\geq 60\text{ °C}$:

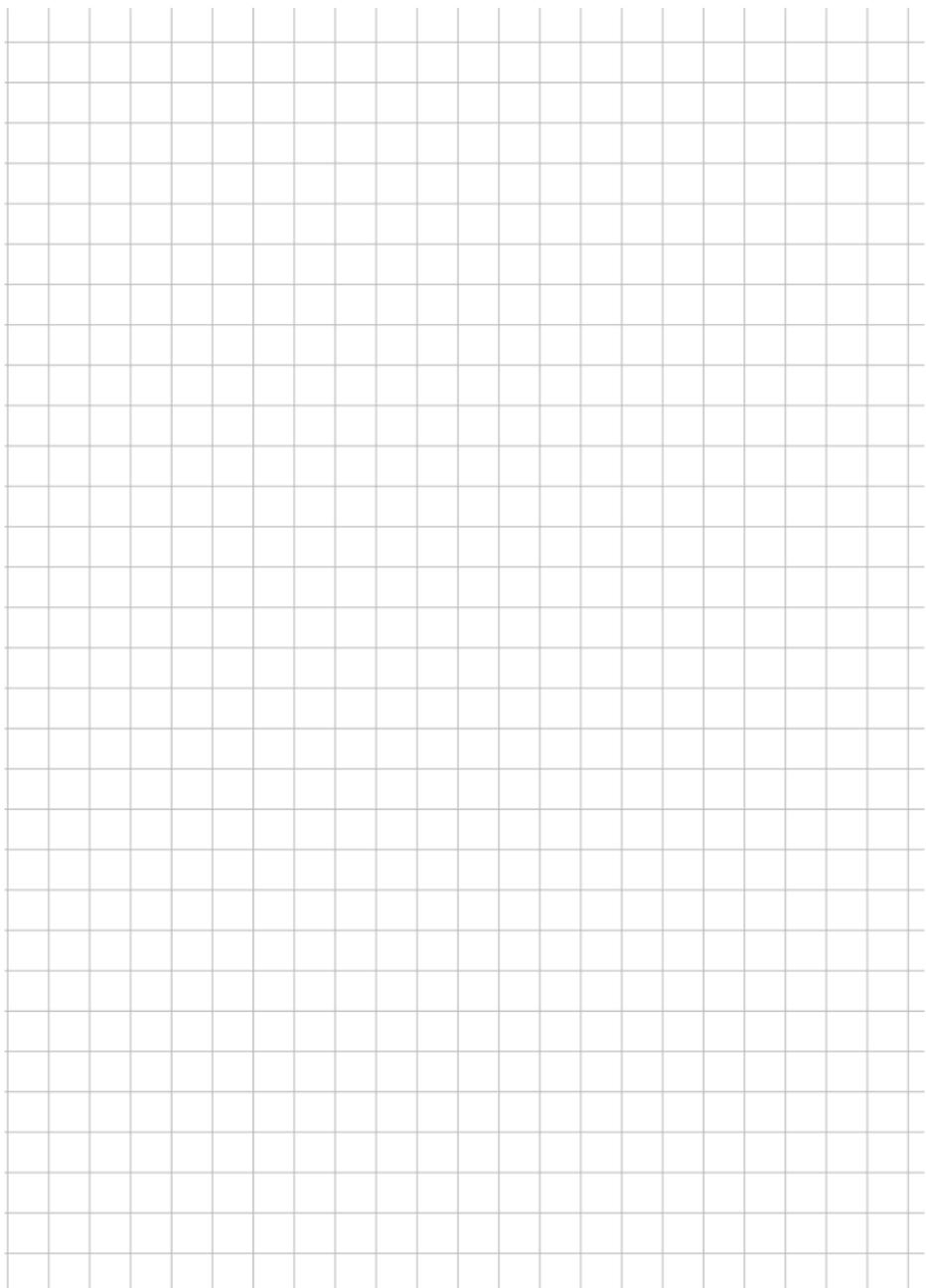
Phase	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Aktivierung der HS-Taq-Polymerase	95 °C	5 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	10 Sekunden	
Primer-Annealing kombiniert mit Elongation (zu diesem Zeitpunkt sollte eine Fluoreszenzdetektion durchgeführt werden)	60–72 °C	30–60 Sekunden	40

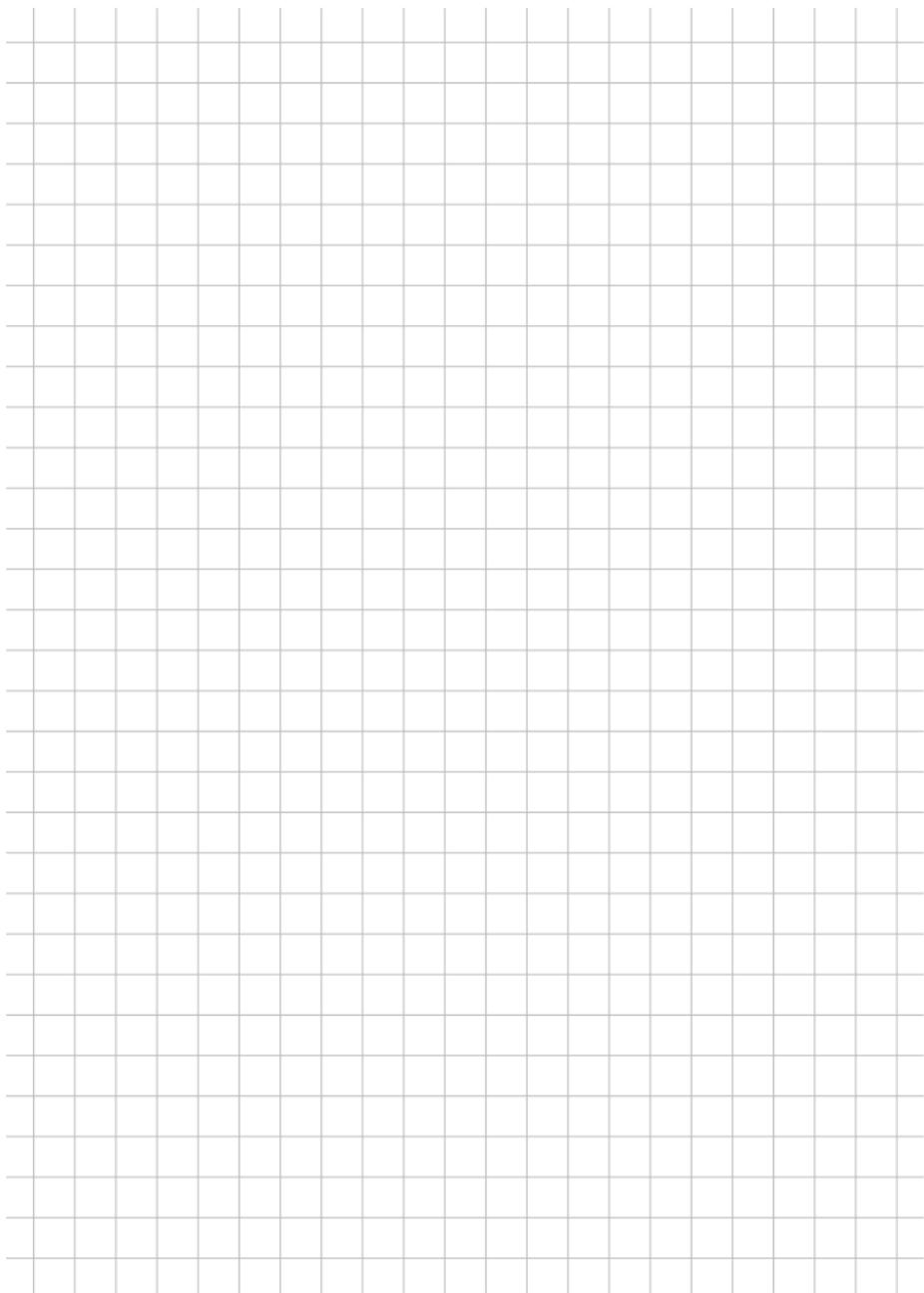
Wenn die Annealingtemperatur der Primer $< 60\text{ °C}$:

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

