Protokoll: qPCR mit dsGreen

dsGreen ist ein sehr empfindlicher Farbstoff für den Nachweis von doppelsträngiger DNA. Beide werden gleichermaßen für den unspezifischen Nachweis von Amplifikaten in qPCR-Experimenten eingesetzt.

1. Falls das dsGreen-Reagenz gefroren gelagert wurde, lassen Sie es bei Raumtemperatur auftauen. Zum schnelleren Auftauen kann das Reagenz vorübergehend auf bis zu 50 °C erwärmt werden.
2. Berechnen Sie die Volumina der für die Reaktion benötigten Ragenzien.

Reagenz	Endkonzentration im Reaktionsansatz
dNTPs	je 2 mM
DMSO	10 % (v/v)
Taq-Polymerasepuffer	1×
Primer 1	0,1-1 µM
Primer 2	0,1-1 µM
Taq-DNA-Polymerase	1,25 units je Ansatz
$MgCl_2$	2 mM
dsGreen	1×

3. Stellen Sie auf Eis einen 1× Mastermix ohne DNA her, indem Sie die Komponenten in der folgenden Reihenfolge mischen: Wasser, DMSO, Taq-Polymerasepuffer, dNTPs, $MgCl_2$, dsGreen, Taq-Polymerase, Primer.
4. Verteilen Sie den Mastermix auf die einzelnen Reaktionsgefäße und geben Sie die DNA hinzu.
5. Gestalten Sie das PCR-Programm entsprechend den Hinweisen von Polymerase- und Gerätehersteller.

Anmerkungen:

Führen Sie stets Positiv- und Negativkontrollen mit, wenn Sie qPCR-Experimente durchführen. Das Temperaturprogramm für die qPCR unterscheidet sich nicht von dem Standard-PCR-Programm für das gegebene DNA-Template und die gewählten Primer. Für die Detektion ist der FAM-Kanal zu verwenden.

Lumiprobe Corporation
201 International Circle, Suite 135
Hunt Valey, Maryland 21030
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH
Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd
Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com