



# Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System

Reagenzienhandbuch



# **Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System**

Reagenzienhandbuch

© Copyright 2006, 2010 Applied Biosystems. All rights reserved.

Information in this document is subject to change without notice. Applied Biosystems assumes no responsibility for any errors that may appear in this document.

APPLIED BIOSYSTEMS DISCLAIMS ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL APPLIED BIOSYSTEMS BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

**NOTICE TO PURCHASER: Label License**

The StepOne™ Real-Time PCR System is covered by US patents and corresponding claims in their non-US counterparts, owned by Applied Biosystems. No right is conveyed expressly, by implication, or by estoppel under any other patent claim, such as claims to apparatus, reagents, kits, or methods such as 5' nuclease methods. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

**NOTICE TO PURCHASER:**

PLEASE REFER TO THE USER'S GUIDE OR PRODUCT INSERT OF THE REAGENTS NAMED HEREIN FOR LIMITED LABEL LICENSE OR DISCLAIMER INFORMATION.

**TRADEMARKS:**

Applera, Applied Biosystems, AB (Design), MicroAmp, Primer Express, and VIC are registered trademarks, and FAM, JOE, MultiScribe, NED, ROX, StepOne, TAMRA, and TET are trademarks of Applied Biosystems or its subsidiaries in the U.S. and/or certain other countries.

AmpErase, AmpliTaq Gold, and TaqMan are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

Bestell-Nr. 4377719 Version B  
06/2010

# Inhalt

## Vorwort

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| Verwendung dieses Handbuchs ..... | vii |
| Zugriff auf Informationen .....   | ix  |
| Technischer Support .....         | xi  |

## Kapitel 1 Einführung

|  |     |
|--|-----|
| Informationen über das StepOne™-System .....           | 1-2 |
| Vorbereiten von Analysen mit dem StepOne™-System ..... | 1-4 |
| Auswahl des Analysetyps .....                          | 1-5 |
| Auswahl des Reagenzientyps .....                       | 1-6 |
| Auswahl des Assay-Typs .....                           | 1-7 |

## Kapitel 2 Reagenzien

|   |     |
|---|-----|
| Überblick .....                             | 2-2 |
| TaqMan®-Reagenzien .....                    | 2-2 |
| SYBR® Green-Reagenzien .....                | 2-4 |
| Auswahl des geeigneten Reagenzientyps ..... | 2-5 |
| Minimieren von DNA-Kontaminationen .....    | 2-7 |

## Kapitel 3 Quantifizierungsanalysen

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Abschnitt 3.1: Informationen zu Quantifizierungsanalysen .....</b> | <b>3-3</b>  |
| Überblick .....   | 3-4         |
| Auswahl einer Quantifizierungsmethode .....                           | 3-5         |
| Auswahl zwischen 1-Schritt- und 2-Schritt-RT-PCR .....                | 3-8         |
| Auswahl von Singleplex- oder Multiplex-PCR .....                      | 3-10        |
| Auswahl des Reagenzientyps .....                                      | 3-13        |
| Auswahl des Assay-Typs .....  | 3-13        |
| <b>Abschnitt 3.2: Design-Hinweise .....</b>                           | <b>3-17</b> |
| Assays Inventarisiert/Auf Bestellung .....                            | 3-18        |
| Inventarisierte TaqMan® Gene Expression Assays .....                  | 3-18        |
| Custom TaqMan® Gene Expression Assays .....                           | 3-20        |
| Auswahl des Master-Mixes .....  | 3-21        |
| Experimentelles Design .....  | 3-22        |

|   |      |
|---|------|
| Eigene Assays .....   | 3-22 |
| Entwerfen von Primern und Sonden mit der Primer Express®-Software ..... | 3-23 |
| Auswahl der Reagenzien .....  | 3-26 |
| Empfohlene Thermocycling-Bedingungen .....                              | 3-28 |
| Optimieren der Primerkonzentrationen .....                              | 3-31 |
| Optimieren der Sondenkonzentration .....                                | 3-34 |
| Weitere Informationen .....   | 3-37 |

## Kapitel 4 Genotypisierungsanalysen

|   |            |
|---|------------|
| <b>Abschnitt 4.1: Informationen zu Genotypisierungsanalysen .....</b> | <b>4-3</b> |
| Überblick .....   | 4-4        |
| Auswahl des Assay-Typs .....  | 4-6        |
| <b>Abschnitt 4.2: Design-Richtlinien .....</b>                        | <b>4-9</b> |
| Vorentworfene/validierte Assays .....                                 | 4-10       |
| TaqMan® SNP Genotyping Assays .....                                   | 4-10       |
| TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays .....                       | 4-11       |
| Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination ..... | 4-12       |
| Auswahl des Master-Mixes .....  | 4-13       |
| Experimentelles Design .....  | 4-13       |
| Eigene (kundenspezifische) Assays .....                               | 4-14       |
| Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays .....                            | 4-14       |
| Auswahl des Master-Mixes .....  | 4-16       |
| Experimentelles Design .....  | 4-16       |

## Kapitel 5 Positiv/Negativ-Analysen

|   |            |
|---|------------|
| <b>Abschnitt 5.1: Informationen zu Positiv/Negativ-Analysen .....</b> | <b>5-3</b> |
| Überblick .....   | 5-4        |
| Auswahl des Assay-Typs .....  | 5-5        |
| <b>Abschnitt 5.2: Design-Richtlinien .....</b>                        | <b>5-9</b> |
| Assays Inventarisiert/Auf Bestellung .....                            | 5-10       |
| TaqMan® Gene Expression Assays .....                                  | 5-10       |
| Custom TaqMan® Gene Expression Assays .....                           | 5-12       |
| TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents .....            | 5-13       |
| Auswahl des Master-Mixes .....  | 5-14       |
| Experimentelles Design .....  | 5-15       |
| Eigene (kundenspezifische) Assays .....                               | 5-15       |

---

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| Anhang A | Formel   |           |
|          | Formel für vergleichende $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ )-Analysen | ..... A-1 |

|          |                                     |  |
|----------|-------------------------------------|--|
| Anhang B | Primer-Limitierung in Multiplex-PCR |  |
|----------|-------------------------------------|--|

|          |  |  |
|----------|--|--|
| Anhang C | Richtlinien zum Assay-Design (Assay Design Guidelines) |  |
|----------|--|--|

Bibliografie

Glossar

Stichwortverzeichnis



# Vorwort

## Verwendung dieses Handbuchs

- Zweck dieses Handbuchs** Dieses Handbuch enthält Informationen über die mit dem Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (StepOne™-System) verwendbaren Reagenzien. Sie finden hier die folgenden Informationen:
- Eine Einführung in die TaqMan®- und SYBR® Green-Reagenzien
  - Beschreibungen und Design-Hinweise für die folgenden Analysetypen:
    - Quantifizierungsanalysen
    - Genotypisierungsanalysen
    - Positiv/Negativ-Analysen
- Zielgruppe** Dieses Handbuch ist für Labormitarbeiter und Laborleiter bestimmt, die mit dem StepOne-System Standardkurven-Analysen ausführen.
- Voraussetzungen** Dieses Handbuch basiert auf folgenden Voraussetzungen:
- Sie müssen Fachkenntnisse über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) haben.
  - Sie müssen sich mit DNA- bzw. RNA-Proben und ihrer Vorbereitung für den PCR-Prozess auskennen.
- Textkonventionen** Dieses Handbuch verwendet die folgenden Konventionen:
- **Fett gedruckter** Text weist auf Benutzeraktionen hin. Zum Beispiel: Geben Sie **0** ein, und drücken Sie dann bei allen übrigen Feldern auf **Enter**.
  - *Kursiv gedruckter* Text weist auf neue und wichtige Wörter hin und wird außerdem zur Hervorhebung verwendet. Zum Beispiel: Erstellen Sie vor einer Analyse *immer* eine neue Matrix.
  - Ein rechtes Pfeilsymbol ( ▶ ) trennt aufeinander folgende Befehle aus einem Dropdown- oder Shortcut-Menü voneinander ab. Zum Beispiel: Wählen Sie **Datei ▶ Öffnen**.
- Beachtungshinweise** In den Applied Biosystems-Dokumenten werden zwei Beachtungshinweise verwendet. Jeder Begriff schreibt einen bestimmten Beachtungs- oder Handlungsgrad vor, wie nachstehend erläutert:
- Hinweis:** - Weist auf interessante oder hilfreiche Informationen hin, die für die Verwendung des Produkts jedoch nicht entscheidend sind.
- WICHTIG!** - Weist auf Informationen hin, die für die sachgemäße Verwendung des Geräts, des Reagenzienkits oder die sichere Verwendung einer Chemikalie nötig sind.

Im Folgenden sind Beispiele für Beachtungshinweise aufgeführt:

**Hinweis:** Sie können auch über die Steuerkonsole auf die Kalibrierungsfunktion zugreifen.

**WICHTIG!** Für die Verifizierung Ihrer Client-Verbindung benötigen Sie einen gültigen Nutzernamen.

## Sicherheitswarnbegriffe

In den Applied Biosystems-Anwenderunterlagen wird durch Verwendung von vier Sicherheitswarnbegriffen auf mögliche Gefahren hingewiesen. Jeder Warnbegriff—**WICHTIG, VORSICHT, WARNUNG, GEFAHR**—beschreibt einen bestimmten Beachtungs- oder Handlungsgrad, wie nachstehend erläutert.

### Definitionen

**WICHTIG!** - Weist auf Informationen hin, die für die sachgemäße Verwendung des Geräts, des Reagenzienkits oder die sichere Verwendung einer Chemikalie nötig sind.



**VORSICHT** – Weist auf eine potenzielle Gefahrensituation hin, deren Missachtung zu kleineren oder moderaten Verletzungen führen könnte. Dieser Begriff kann auch dazu verwendet werden, um auf sicherheitsgefährdende Handlungen hinzuweisen.



**WARNUNG** – Weist auf eine potenzielle Gefahrensituation hin, deren Missachtung zu Lebensgefahr oder schweren Verletzungen führen könnte.



**GEFAHR** – Weist auf eine unmittelbare Gefährdung hin, die bei Missachtung lebensgefährlich ist oder zu schweren Verletzungen führt. Dieses Signalwort wird nur für absolute Extremsituationen verwendet.

Mit Ausnahme der WICHTIG-Hinweise werden die Sicherheitswarnbegriffe in den Applied Biosystems-Dokumenten zusammen mit einem Dreieck angezeigt, das ein Gefahrensymbol enthält. Diese Gefahrensymbole sind mit den Gefahrensymbolen identisch, die an den Applied Biosystems-Geräten angebracht sind.

### Beispiele

**WICHTIG!** Sie müssen für jede 96-Well-Platte eine eigene Tabellenkalkulation erstellen, in die Sie die Proben eintragen.



**VORSICHT CHEMISCHE GEFAHREN TaqMan® Universal PCR Master Mix** kann Augen- und Hautreizungen hervorrufen. Durch Schlucken oder Einatmen können Beschwerden verursacht werden. Lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt, und befolgen Sie die Handhabungsanweisungen. Tragen Sie eine geeignete Schutzbrille sowie Schutzkleidung und -handschuhe.



**WARNUNG VERLETZUNGSGEFAHR** Beim Betrieb des Geräts können Heizdeckel und Heizblock Temperaturen von über 100 °C erreichen.



**VORSICHT ELEKTRISCHE SPANNUNG** Für einen sicheren Gerätebetrieb ist die Aufrechterhaltung der Erdung unerlässlich. Betreiben Sie das System nie ohne angeschlossenen Erdleiter.

## Zugriff auf Informationen

### Dazugehörige Dokumentation

Im Lieferumfang des StepOne-Systems ist die folgende Dokumentation enthalten:

| Dokument  | Englische BN | Deutsche BN |
|---|--------------|-------------|
| <i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Genotyping Experiments</i>  | 4376786      | 4377728     |
| <i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments</i>                                      | 4376787      | —           |
| <i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C<sub>T</sub> Experiments</i> | 4376785      | 437773      |
| <i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Standard Curve Experiments</i>  | 4376784      | 4377737     |
| <i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation, Maintenance, and Networking Guide</i>   | 4376782      | 4377799     |
| <i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Quick Reference Card</i>   | 4376783      | 4377793     |
| <i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Site Preparation Guide</i>  | 4376768      | 4378360     |
| <i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software Help</i>   | —            | —           |

Die folgende Begleitdokumentation ist von Applied Biosystems erhältlich:

| <b>Dokument</b>  | <b>BN</b> |
|--|-----------|
| <i>Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol</i>   | 4375575   |
| <i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Performance Verification Protocol</i>                   | 4376791   |
| <i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Qualification-Operation Qualification Protocol</i>      | 4376790   |
| <i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Planned Maintenance Protocol</i>                                     | 4376788   |
| <i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>  | 4334429   |
| <i>Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol: Submission Guidelines</i>   | 4367671   |
| <i>Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>   | 4334431   |
| <i>Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Protocol</i>  | 4367218   |
| <i>Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol</i>  | 4312214   |
| <i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>  | 4362460   |
| <i>SYBR® Green PCR and RT-PCR Reagents Protocol</i>  | 4304965   |
| <i>SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Reagents Protocol</i>   | 4310251   |
| <i>TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol</i>  | 4362038   |
| <i>TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents Protocol</i>   | 4308335   |
| <i>TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) Protocol</i>   | 4351891   |
| <i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>   | 4333458   |
| <i>TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>  | 4332856   |
| <i>TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol</i>   | 4304449   |
| <i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>  | 4303859   |
| <i>Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies Application Note</i> | 127AP08   |

**Hinweis:** Weitere Informationen finden Sie unter „Technischer Support“ auf Seite xi.

## Auf Informationen der Software-Hilfe zugreifen

In der Hilfefunktion der Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software (StepOne™-Software) finden Sie eine Beschreibung aller Funktionen der Benutzeroberfläche. Sie haben folgende Möglichkeiten, um auf die Hilfefunktion der StepOne-Software zuzugreifen:

- Drücken Sie auf **F1**.
- Klicken Sie auf  in der Symbolleiste.
- Wählen Sie **Help ▶ StepOne Help** (Hilfe ▶ StepOne-Hilfe).

So können Sie in der Hilfefunktion nach Themen suchen:

- Sehen Sie im Inhaltsverzeichnis nach.
- Suchen Sie nach einem bestimmten Thema.
- Suchen Sie im alphabetischen Index.

## Kunden-Feedback

Applied Biosystems ist für Kommentare und Vorschläge zur Verbesserung der Anwenderunterlagen dankbar. Sie können Ihre Kommentare an die folgende E-Mail-Adresse schicken:

**techpubs@appliedbiosystems.com**

**WICHTIG!** Bitte schicken Sie an die oben angegebene E-Mail-Adresse nur Kommentare und Vorschläge zu unseren Dokumentationen. Wenn Sie Unterlagen bestellen oder PDF-Dateien herunterladen möchten, oder wenn Sie eine technische Frage haben, gehen Sie auf **www.appliedbiosystems.com**, und klicken Sie dort auf den **Support-Link** (siehe „Technischer Support“ unten).

## Technischer Support

Die aktuellen Service- und Support-Informationen für alle Standorte erhalten Sie durch Klicken auf den **Support-Link** unter **www.appliedbiosystems.com**.

Auf der Support-Seite haben Sie die folgenden Möglichkeiten:

- In den häufig gestellten Fragen (FAQs) suchen
- Eine Frage direkt an den technischen Support richten
- Applied Biosystems-Anwenderunterlagen, Sicherheitsdatenblätter, Analysezertifikate oder sonstige Dokumente bestellen
- PDF-Dokumente herunterladen
- Informationen über Kundens Schulungen abrufen
- Softwareaktualisierungen und -Patches herunterladen

Darüber hinaus finden Sie auf der Support-Seite die weltweiten Telefon- und Faxnummern der Kundenservice- und Verkaufsstellen von Applied Biosystems.

**WICHTIG!** Wenn Sie von diesem Handbuch dazu angewiesen werden, oder wenn Sie einen Wartungstermin für Ihr StepOne™-Gerät vereinbaren möchten (z. B. anberaumte Jahreswartung oder Temperaturprüfung/-kalibrierung), kontaktieren Sie das Kundenservicezentrum von Applied Biosystems. Unter **http://www.appliedbiosystems.com/support/contact** finden Sie die entsprechenden Telefonnummern oder können eine E-Mail an das Kundenservicezentrum schicken.



Dieses Kapitel umfasst die folgenden Themen:

|   |     |
|---|-----|
| Informationen über das StepOne™-System.....           | 1-2 |
| Vorbereiten von Analysen mit dem StepOne™-System..... | 1-4 |
| Auswahl des Analysetyps .....                         | 1-5 |
| Auswahl des Reagenzientyps .....                      | 1-6 |
| Auswahl des Assay-Typs.....                           | 1-7 |

# Informationen über das StepOne™-System

Das Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (StepOne™-System) verwendet fluoreszenz-basierende PCR Reagenzien (Polymerase Kettenreaktion) zur Durchführung von:

- Quantitative Detektion von Zielsequenzen auf einer Nukleinsäure mittels Echtzeit-Analyse
- Quantitative Detektion von Zielsequenzen auf einer Nukleinsäure mittels Endpunkt- und Schmelzkurvenanalyse

## Informationen zur Datenerfassung

Das StepOne-System erfasst in Abhängigkeit von dem gewählten Laufprofil während einer PCR an verschiedenen Punkten Fluoreszenzrohdaten:

| Laufprofil     |   | Datenerfassungspunkt   |
|----------------|---|--|
| Echtzeit-Läufe | Standardkurve                                       | Das System erfasst Daten nach jedem PCR-Extensionsschritt.   |
|                | Relative Standardkurve                              |  |
|                | Vergleichende C <sub>T</sub> ( $\Delta\Delta C_T$ ) |  |
| Endpunkt-Läufe | Genotypisierung                                     | Das Gerät erfasst Daten vor und nach der PCR. Die StepOne-Software kann Daten auch während des Laufs erfassen (Echtzeit), was bei der Problembeseitigung eine große Hilfe sein kann. |
|                | Positiv/Negativ-Analysen                            | Das Gerät erfasst Daten vor und nach der PCR.  |

Unabhängig vom Laufprofil besteht ein Datenerfassungspunkt bzw. eine *Messung* aus drei Phasen:

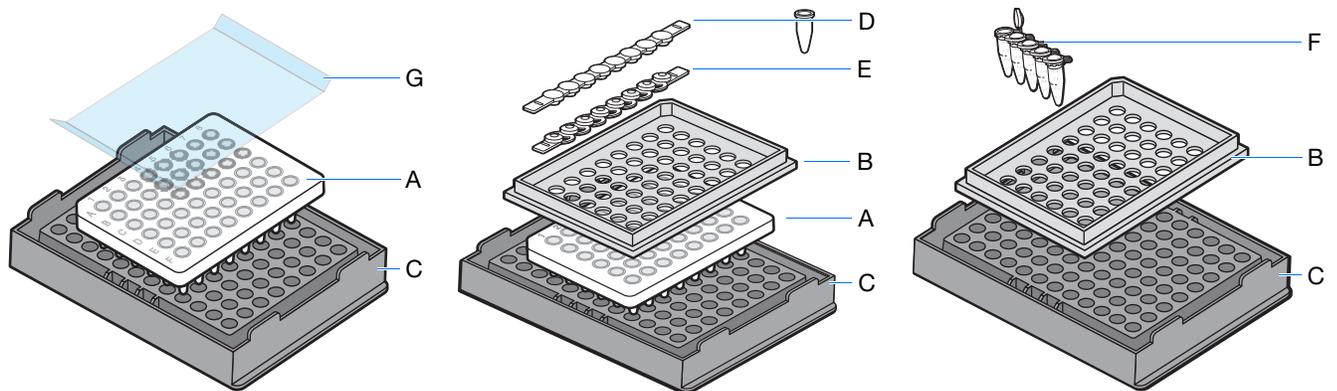
1. **Anregung:** Das StepOne™-System strahlt alle Wells der Reaktionsplatte innerhalb des StepOne-Systems aus, wodurch die Fluorophoren in jeder Reaktion angeregt werden.
2. **Emission:** Die Optik des StepOne-Geräts erfasst die von den Wells der Reaktionsplatte abgegebene Restfluoreszenz. Das daraus resultierende, vom Gerät erfasste Bild, besteht nur aus dem Licht, das dem Emissionswellenlängenbereich entspricht.
3. **Erfassung:** Das StepOne-System erstellt eine digitale Darstellung der über einen festgelegten Zeitraum erfassten Fluoreszenz. Die StepOne™-Software speichert die Fluoreszenzrohdaten zur Analyse.

Nach Durchführung eines Laufs bestimmt die StepOne-Software anhand von Kalibrierungsdaten (durch räumliche, Farbstoff- und Hintergrundkalibrierung) den Ort und die Intensität von Fluoreszenzsignalen in jeder Messung, den mit dem jeweiligen Fluoreszenzsignal verbundenen Farbstoff und die Aussagefähigkeit des Signals.

## Unterstützte Verbrauchsmaterialien

Das StepOne-System unterstützt die unten aufgelisteten Verbrauchsmaterialien. Diese Verbrauchsmaterialien können sowohl mit Standard- als auch mit Fast-Reagenzien/Protokollen verwendet werden.

| Verbrauchsmaterial   | Bestell-Nr.   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates</li> <li>• MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film</li> </ul>                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4375816</li> <li>• 4375323</li> </ul>                    |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips</li> <li>• MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4358293</li> <li>• 4323032</li> </ul>                    |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4358297</li> </ul>                                       |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• MicroAmp™ Fast 48-Well Trays</li> <li>• MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor</li> <li>• MicroAmp™ Splash Free 96-Well Base</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4375282</li> <li>• 4375284</li> <li>• 4312063</li> </ul> |



| # | Verbrauchsmaterial                            |
|---|---|
| A | MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate |
| B | MicroAmp™ Fast 48-Well Tray                   |
| C | MicroAmp™ Splash Free 96-Well Base            |
| D | MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip                 |
| E | MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip                   |
| F | MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps       |
| G | MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film       |

## Weitere Informationen

Weitere Informationen über ein Thema dieses Handbuchs finden Sie in der Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software Help, indem Sie entweder **F1** drücken, in der Symbolleiste auf  klicken oder **Help ▶ StepOne Help** (Hilfe ▶ StepOne-Hilfe) wählen.

# Vorbereiten von Analysen mit dem StepOne™-System

**Allgemeiner Arbeitsablauf** Bereiten Sie eine Analyse vor ihrer Durchführung auf dem StepOne-System folgendermaßen vor:

1. Wählen Sie einen Analysetyp (Seite 1-5).
2. Wählen Sie den Reagenzientyp aus (Seite 1-6).
3. Wählen Sie den Assay-Typ aus (Seite 1-7).

**Informationen in diesem Handbuch** Dieses Kapitel enthält allgemeine Informationen über die für das StepOne-System geeigneten Analyse-, Reagenzien- und Assay-Typen.

In den nächsten Kapiteln finden Sie die folgenden Informationen:

| Kapitel                             | Beschreibung   |
|-------------------------------------|--|
| Kapitel 2, Reagenzien               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Beschreibung und Vergleich der TaqMan®- und SYBR® Green-Reagenzien</li> <li>• Informationen über die Minimierung von DNA-Kontamination</li> </ul>                                     |
| Kapitel 3, Quantifizierungsanalysen | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Beschreibung der Funktionsweise des Analysetyps</li> <li>• Darstellung eines für den Analysetyp spezifischen Arbeitsablaufs</li> <li>• Design-Hinweise für jeden Assay-Typ</li> </ul> |
| Kapitel 4, Genotypisierungsanalysen |  |
| Kapitel 5, Positiv/Negativ-Analysen |  |

## Auswahl des Analysetyps

Sie können die folgenden Analysetypen mit dem StepOne-System durchführen:

- Quantifizierung, einschließlich:
  - Standardkurve
  - Relative Standardkurve
  - Vergleichende  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )
- Genotypisierung
- Positiv/Negativ-Analysen

**Hinweis:** Sie können mit dem StepOne-System auch Schmelzkurvenanalysen ausführen.

### Endpunkt- Analyse im Vergleich zur Echtzeit-Analyse

Die drei Analysetypen können entsprechend der folgenden Beschreibung in Echtzeit- und Endpunktanalyse unterteilt werden.

| Kategorie | Eigenschaften  | Analysetyp      |
|-----------|--|-----------------|
| Echtzeit  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Das Gerät überwacht den Verlauf der PCR während sie abläuft. ‡</li> <li>• Die Erfassung von Daten erfolgt während des PCR-Prozesses.</li> <li>• Reaktionen werden durch den Zeitpunkt während der PCR charakterisiert, an dem die Amplifikation einer Zielsequenz zum ersten Mal erkannt wird. §</li> </ul>   | Quantifizierung |
| Endpunkt  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Die Erfassung von Daten erfolgt am Ende des PCR-Prozesses.</li> <li>• Reaktionen werden durch die Menge der am Ende der PCR akkumulierten Zielsequenz charakterisiert. §</li> <li>• Der Datenpunkt ist die normalisierte Intensität des Reporter-Farbstoffs oder <math>R_n</math>.</li> </ul> <p><b>Hinweis:</b> Einige Endpunktanalysen enthalten auch Prä-PCR-Datenpunkte. In diesem Fall berechnet das System den Delta <math>R_n</math> (<math>\Delta R_n</math>)-Wert anhand der folgenden Formel:</p> $R_n \text{ Post-PCR} - R_n \text{ Prä-PCR} = \Delta R_n$ | Genotypisierung |
|           |  | Positiv/Negativ |

‡ Kwok und Higuchi, 1989.

§ Saiki *et al.*, 1985.

## Auswahl des Reagenzientyps

Sie können die folgenden Reagenzientypen (Chemikalien) mit dem StepOne-System verwenden:

- TaqMan<sup>®</sup>-Reagenzien
- SYBR<sup>®</sup> Green-Reagenzien
- Andere fluoreszenzmarkierte Reagenzien

### TaqMan-Reagenzien

Die TaqMan-Reagenzien umfassen TaqMan<sup>®</sup>-Assays (vorformulierte Mixe mit Sonden- und Primersets) und TaqMan<sup>®</sup>-Master-Mixe. Sie können TaqMan-Reagenzien für die folgenden Analysetypen verwenden:

- Quantifizierung, einschließlich:
  - Standardkurve
  - Relative Standardkurve
  - Vergleichende C<sub>T</sub> ( $\Delta\Delta C_T$ )
- Genotypisierung
- Positiv/Negativ

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA<sup>™</sup>-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.

### SYBR Green-Reagenzien

SYBR Green-Reagenzien umfassen Primer und Master-Mixe, die SYBR<sup>®</sup> Green-Farbstoff enthalten. Sie können SYBR Green-Reagenzien für Quantifizierungsanalysen verwenden:

- Standardkurve
- Relative Standardkurve
- Vergleichende C<sub>T</sub> ( $\Delta\Delta C_T$ )

**Hinweis:** Sie können mit SYBR Green-Reagenzien keine Multiplex-PCR ausführen. Weitere Informationen finden Sie unter „Auswahl von Singleplex- oder Multiplex-PCR“ auf Seite 3-10.

### Andere Reagenzien

Sie können andere fluoreszenzmarkierte Reagenzien mit dem StepOne-System verwenden, beachten Sie dabei aber Folgendes:

- Die StepOne-Software berechnet automatisch die Reaktionsvolumen für die TaqMan- und SYBR Green-Reagenzien, aber nicht für andere Reagenzien.
- Sie müssen mithilfe des Setups für Fortgeschrittene (und nicht mit dem Analysedesign-Assistenten) Ihre eigene Analyse erstellen.

## Auswahl des Assay-Typs

In der StepOne-Software können Sie die folgenden Assay-Typen für Quantifizierungs-, Positiv/Negativ- und Genotypisierungsanalysen auswählen:

| Analysetyp                   | Assay-Typ   | Siehe...  |
|------------------------------|---|-----------|
| Quantifizierung <sup>‡</sup> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Inventorized/Made to Order (Auf Bestellung)</li> <li>Custom (Kundenspezifisch)</li> </ul>  | unten     |
| Positiv/Negativ              |   |           |
| Genotypisierung              | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pre-Designed/Validated (Vorentworfen/Validiert)</li> <li>Custom (Kundenspezifisch)</li> <li>User-Designed (Benutzerdefiniert)</li> </ul> | Seite 1-8 |

<sup>‡</sup> Zu den Quantifizierungsanalysen zählen Standardkurven-, relative Standardkurven- und vergleichende C<sub>T</sub>-Analysen.

### Quantifizierungs- und Positiv/Negativ-Analysen

#### Assays Inventarisiert/Auf Bestellung

Wählen Sie für die Ausführung von Quantifizierungs- oder Positiv/Negativ-Analysen in der StepOne-Software den Assay-Typ Inventorized/Made to Order (Inventarisiert/Auf Bestellung) bei Verwendung der folgenden Assays:

- **TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays, inventarisiert** – Vorentworfene und mit dem FAM<sup>™</sup>-Farbstoff markierte TaqMan<sup>®</sup> MGB (Minor Groove Binder)-Sonden- und Primersets, die serienmäßig produziert und bestellt werden können. Der Assay-Mix ist als gebrauchsfertige Mischung in einem 20X-Röhrchen erhältlich.
- **TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays, auf Bestellung** – Vorentworfene und mit FAM-Farbstoff markierte TaqMan MGB-Sonden- und Primersets, die auf Bestellung produziert werden. Der Assay-Mix ist als gebrauchsfertige Mischung in einem 20X-Röhrchen erhältlich.
- **Custom TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays** – Mit FAM-Farbstoff markierte TaqMan MGB-Sonden- und Primersets, die vom Custom TaqMan<sup>®</sup> Genomic Assays Service aufgrund der vom Kunden bereitgestellten Sequenzinformationen entworfen, synthetisiert und formuliert werden. Der Assay-Mix ist als gebrauchsfertige Mischung in einem 20X- oder 60X-Röhrchen erhältlich.

**Hinweis:** Um den Assay-Typ in der StepOne-Software auszuwählen, öffnen Sie im Bildschirm Reaction Setup (Reaktionseinrichtung/Pipettierprotokoll) entweder den Design Wizard (Analysedesign-Assistent) oder den Arbeitsablauf Advanced Setup (Setup für Fortgeschrittene). Wählen Sie dann aus dem Dropdown-Menü Assay Type (Assay-Typ) die Option **Inventorized/Made to Order** (Inventarisiert/Auf Bestellung).

### Eigene Assays

Wählen Sie für Quantifizierungs- und Positiv/Negativ-Analysen den Assay-Typ Custom in der StepOne-Software, wenn Sie Ihre eigenen Assays (Primer und Sonden) mithilfe der Primer Express® Software und TaqMan- oder SYBR Green-Reagenzien entwerfen. Befolgen Sie beim Design eigener Assays die Hinweise zum Assay-Design von Applied Biosystems zur Optimierung der Ergebnisse.

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.

**Hinweis:** Um den Assay-Typ in der StepOne-Software auszuwählen, öffnen Sie im Bildschirm Reaction Setup (Reaktionseinrichtung/Pipettierprotokoll) entweder den Design Wizard (Analysedesign-Assistent) oder den Arbeitsablauf Advanced Setup (Erweiterte Einrichtung). Wählen Sie dann aus dem Dropdown-Menü Assay Type (Assay-Typ) die Option **Custom** (Kundenspezifisch).

### Genotypisierungsanalysen

#### Vorentworfene/validierte Assays

Bei Genotypisierungsanalysen umfasst der Assay-Typ (Pre-designed/Validated) Folgendes:

- **TaqMan® SNP Genotyping Assays** – Vorentworfene, mit FAM™- sowie VIC®-Farbstoff markierte TaqMan® MGB (Minor Groove Binder) -Sonden- und Primersets, die in zwei Kategorien verfügbar sind:
  - TaqMan® Validated & Coding SNP Genotyping Assays, die serienmäßig produziert und verkauft werden (inventorized). Der Assay-Mix ist als gebrauchsfertige Mischung in einem 20X-Röhrchen erhältlich.
  - TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assays, die auftragsabhängig hergestellt werden (Made to Order). Der Assay-Mix ist als gebrauchsfertige Mischung in einem 20X-Röhrchen erhältlich.
- **TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays** – Vorentworfene und mit FAM- sowie VIC-Farbstoff markierte TaqMan MGB-Sonden- und Primersets, die serienmäßig produziert und verkauft werden (inventorized). Der Assay-Mix ist als gebrauchsfertige Mischung in einem 20X-Röhrchen erhältlich.
- **Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination (TaqMan® PDARs for AD)** – Vorentworfene und mit FAM- sowie VIC-Farbstoff markierte TaqMan MGB-Sonden- und Primersets, die serienmäßig produziert und verkauft werden (inventorized). Der Assay-Mix ist als gebrauchsfertige Mischung in einem 10X-Röhrchen erhältlich.

**Hinweis:** Um einen SNP-Assay in der StepOne-Software auszuwählen, öffnen Sie den Bildschirm SNP-Assays im Arbeitsablauf des Analysedesign-Assistenten oder den Bildschirm Plate Setup (Platteneinrichtung) im Setup für Fortgeschrittene. Im Bildschirm SNP Assays oder Plate Setup (Platteneinrichtung) können Sie aus der Bibliothek einen Assay auswählen oder einen neuen Assay erstellen.

### Custom (Kundenspezifische) Assays

Bei Genotypisierungsanalysen umfasst der kundenspezifische Assay-Typ die Custom TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays. Die Custom TaqMan SNP Genotyping Assays sind mit FAM- und VIC-Farbstoff markierte TaqMan MGB-Sonden- und Primersets, die vom Custom TaqMan<sup>®</sup> Genomic Assays Service aufgrund der vom Kunden bereitgestellten Sequenzinformationen entworfen, synthetisiert und formuliert werden. Der Assay-Mix ist als gebrauchsfertige Mischung in einem 40X- oder 80X-Röhrchen erhältlich.

**Hinweis:** Um einen SNP-Assay in der StepOne-Software auszuwählen, öffnen Sie den Bildschirm SNP-Assays im Arbeitsablauf des Analysedesign-Assistenten oder den Bildschirm Plate Setup (Platteneinrichtung) im Setup für Fortgeschrittene. Im Bildschirm SNP Assays oder Plate Setup (Platteneinrichtung) können Sie aus der Bibliothek einen Assay auswählen oder einen neuen Assay erstellen.

### Eigene Assays

Anleitungen für den Entwurf eigener Primer und Sonden für SNP-Assays finden Sie im Einführungshandbuch für die *Primer Express<sup>®</sup> Software Version 3.0*.

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA<sup>™</sup>-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.



Dieses Kapitel umfasst die folgenden Themen:

|   |     |
|---|-----|
| Überblick .....                             | 2-2 |
| TaqMan <sup>®</sup> -Reagenzien .....       | 2-2 |
| SYBR <sup>®</sup> Green-Reagenzien .....    | 2-4 |
| Auswahl des geeigneten Reagenzientyps ..... | 2-5 |
| Minimieren von DNA-Kontaminationen .....    | 2-7 |

## Überblick

Applied Biosystems hat die folgenden zwei Typen von Reagenzien (Chemikalien) für den Nachweis von PCR-Produkten mit dem StepOne™ Real-Time PCR System von Applied Biosystems entwickelt:

- TaqMan®-Reagenzien (siehe unten)
- SYBR® Green-Reagenzien (Seite 2-4)

## TaqMan®-Reagenzien

**Analysetypen** Die TaqMan®-Reagenzien umfassen TaqMan®-Assays (gebrauchsfertige Mixe mit Sonden- und Primersets) und TaqMan®-Master-Mixe. Die Assays sind für die jeweiligen Zielsequenzen spezifisch. Die Master-Mixe enthalten die übrigen für die PCR-Reaktion benötigten Komponenten. Sie können TaqMan-Reagenzien für die folgenden Analysetypen verwenden:

- Quantifizierung, einschließlich:
  - Standardkurve
  - Relative Standardkurve
  - Vergleichende  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )
- Genotypisierung
- Positiv/Negativ

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.

**Entwicklung von TaqMan-Reagenzien** Ursprünglich wurden für den Nachweis von Echtzeit-PCR-Produkten Interkalatoren verwendet. Der größte Nachteil dieser Methode ist, dass die Akkumulation sowohl spezifischer als auch unspezifischer PCR-Produkte gemessen wird.

Eine Verbesserung der Echtzeit-PCR-Systeme konnte durch die Einführung von fluorogenen Sonden erzielt werden, welche die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase nutzen. Die Verfügbarkeit fluorogener Sonden ermöglichte die Entwicklung einer Echtzeitmethode, bei der nur spezifische Amplifikate detektiert werden.

**Funktionsweise der TaqMan-Reagenzien** TaqMan-Reagenzien verwenden eine fluorogene Sonde zur Detektion eines spezifischen PCR-Produkts bei seiner Akkumulation während der PCR. Dies funktioniert wie im Folgenden beschrieben:

1. Ein fluoreszierender Reporter-Farbstoff wird an das 5'- und ein Quencher an das 3'-Ende einer Oligonukleotid-Sonde angebracht.

Die abgestrahlte Fluoreszenz des Reporters wird in der intakten Sonde durch die räumliche Nähe zum Quencher-Farbstoff aufgrund des sogenannten Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET; Förster-Resonanz, Förster, V. T. 1948) unterdrückt, solange die Sonde intakt ist.

2. Wenn die Zielsequenz vorhanden ist, bindet die Sonde während des Annealings zwischen den Primerbindungsstellen und wird während der Extension durch die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase gespalten.
3. Die Spaltung der Sonde wirkt sich folgendermaßen aus:
  - Reporter und Quencher werden getrennt, was zu einem Ansteigen des Fluoreszenzsignals des Reporters führt.
  - Die Sonde wird von der Zielsequenz entfernt, so dass die Extension bis zum Ende des Template-Strangs vervollständigt wird. Somit hemmt die Verwendung der Sonde nicht den PCR-Prozess.
4. Mit jedem Zyklus werden mehr Reporter-moleküle von den entsprechenden Sonden abgespalten, wodurch sich die Fluoreszenzintensität proportional zur Quantität des produzierten Amplikons erhöht. Je höher die anfängliche Kopienzahl der Zielnukleinsäuresequenz, desto früher ist eine signifikante Verstärkung der Fluoreszenz festzustellen.

Abbildung 2-1 veranschaulicht diesen Prozess.

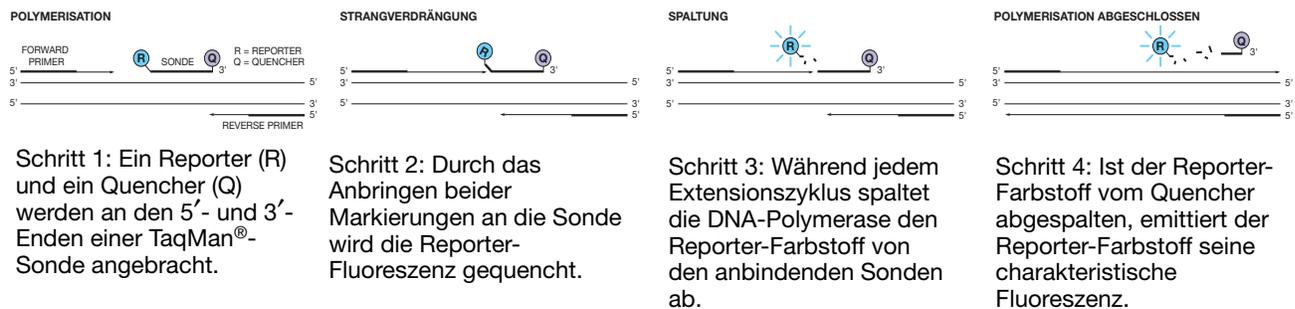


Abbildung 2-1 Funktionsweise der TaqMan-Reagenzien

### TaqMan-MGB-Sonden

Applied Biosystems empfiehlt die allgemeine Verwendung von TaqMan<sup>®</sup>-MGB-Sonden, insbesondere wenn konventionelle TaqMan<sup>®</sup>-Sonden aus mehr als 30 Nukleotiden bestehen würden. TaqMan-MGB-Sonden enthalten die folgenden Komponenten:

- **Einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff am 5'-Ende**, der ein Signal aussendet, wenn er durch die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase abgespalten wird.
- **Einen nicht fluoreszierenden Quencher (NFQ) am 3'-Ende**, der Real-Time PCR Systemen aufgrund der fehlenden Fluoreszenz des Quenchers eine exaktere Messung der Reporter-Farbstoff-Fluoreszenz ermöglicht.
- **Einen MGB (minor groove binder) am 3'-Ende**, der die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Sonden erhöht, ohne die Sonden zu verlängern (Afonina *et al.*, 1997; Kutuyavin *et al.*, 1997). Dies ermöglicht das Design kürzerer Sonden. Folglich zeigen TaqMan-MGB-Sonden größere Unterschiede zwischen den  $T_m$ -Werten der passenden und der nicht passenden Sonde. Größere Unterschiede bei den  $T_m$ -Werten führen daher zu einer exakteren Genotypisierung.

Applied Biosystems bietet die folgenden vorentworfenen TaqMan-Sonden mit NFQ für die Verwendung mit dem StepOne™-System:

|   |                                      | 5'-Farbstoffmarkierungen                | 3'-Farbstoffmarkierungen | Andere Funktionen |
|---|--------------------------------------|---|--------------------------|-------------------|
| TaqMan®-Assays (TaqMan®-MGB-Sonde)          | Genexpression                        | FAM™-Farbstoff                          | NFQ                      | MGB               |
|   | SNP-Genotypisierung                  | FAM™- und VIC®-Farbstoffe               | NFQ                      | MGB               |
| Custom TaqMan® - Assays (TaqMan®-MGB-Sonde) | Genexpression                        | FAM™-Farbstoff                          | NFQ                      | MGB               |
|   | SNP-Genotypisierung                  | FAM™- und VIC®-Farbstoffe               | NFQ                      | MGB               |
| Kundenspezifische Sonden                    | Kundenspezifische TaqMan®-MGB-Sonden | FAM™-, TET™-, NED™- oder VIC®-Farbstoff | NFQ                      | MGB               |

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.

## SYBR® Green-Reagenzien

**Analysetypen** SYBR® Green-Reagenzien umfassen Primer und Master-Mixe, die SYBR® Green-Farbstoff enthalten. Sie können SYBR Green-Reagenzien für Quantifizierungsanalysen verwenden:

- Standardkurve
- Relative Standardkurve
- Vergleichende C<sub>T</sub> ( $\Delta\Delta C_T$ )

**Hinweis:** Sie können mit SYBR Green-Reagenzien keine Multiplex-PCR ausführen. Weitere Informationen finden Sie unter „Auswahl von Singleplex- oder Multiplex-PCR“ auf Seite 3-10.

**Entwicklung von SYBR Green-Reagenzien** Kleine Moleküle, die an doppelsträngige DNA binden, können in zwei Klassen unterteilt werden: solche, die in der DNA interkalieren und solche, die an der kleinen Furche der DNA binden. Higuchi (Higuchi *et al.*, 1992) verwendeten den Interkalator Ethidiumbromid zur Real-Time Detektion der PCR. Hoechst 33258 ist ein Beispiel für einen Minor Groove Binder, dessen Fluoreszenz sich bei der Bindung an doppelsträngige DNA verstärkt (Higuchi *et al.*, 1993).

Unabhängig von der Bindungsmethode gibt es mindestens zwei Anforderungen für DNA-bindende Farbstoffe für den Real-Time Nachweis von PCR-Produkten:

- Erhöhte Fluoreszenz bei der Bindung an doppelsträngige DNA
- Keine Hemmung der PCR

Applied Biosystems hat Reaktionsbedingungen entwickelt, die die Verwendung des Farbstoffs SYBR® Green I in der PCR ohne PCR-Hemmung und mit einer erhöhten Nachweissensitivität im Vergleich zu Ethidiumbromid ermöglicht.

**Funktionsweise der SYBR Green-Reagenzien**

Die SYBR-Green-Reagenzien verwenden den Farbstoff SYBR Green I zum Nachweis der PCR-Produkte, der an die doppelsträngige DNA bindet, die während der PCR entsteht. Dies funktioniert wie im Folgenden beschrieben:

1. Wenn der SYBR® Green PCR Master Mix zu einer Probe hinzugefügt wird, bindet der Farbstoff SYBR Green I sofort an alle doppelsträngigen DNA-Sequenzen.
2. Während der PCR amplifiziert AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase, wodurch das PCR-Produkt bzw. das „Amplikon“ gebildet wird.
3. Der Farbstoff SYBR Green I bindet an jede neue Kopie der doppelsträngigen DNA.
4. Während des weiteren Verlaufs der PCR entsteht immer mehr Amplikon. Da der Farbstoff SYBR Green I an alle doppelsträngigen DNA-Sequenzen bindet, erhöht sich die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge des entstehenden doppelsträngigen PCR-Produkts.

Abbildung 2-2 veranschaulicht diesen Prozess.

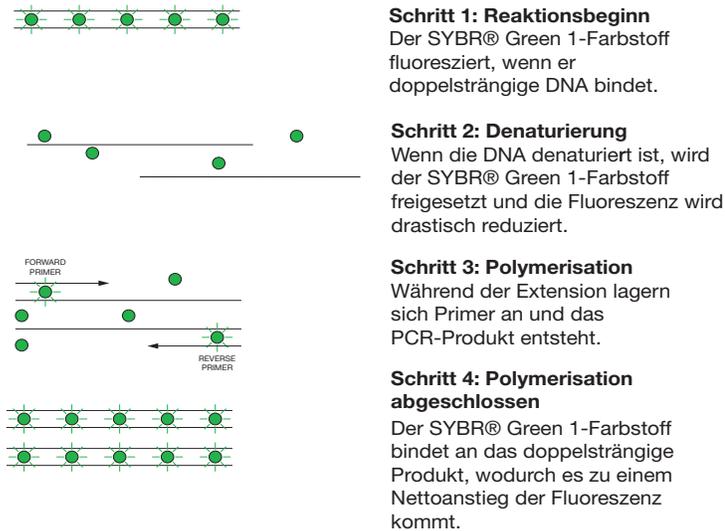


Abbildung 2-2 Funktionsweise der SYBR-Green-Reagenzien

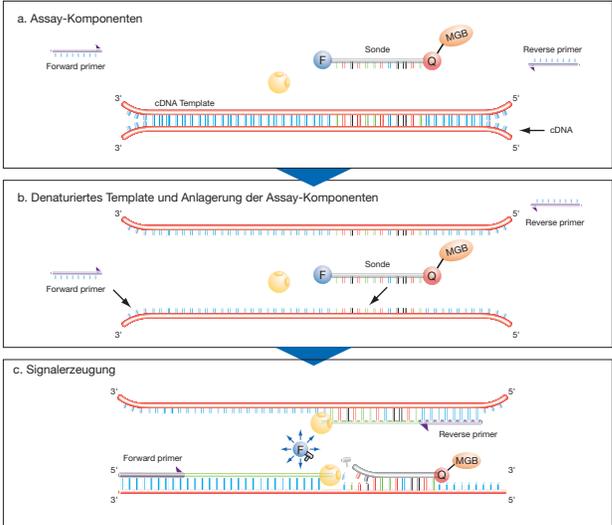
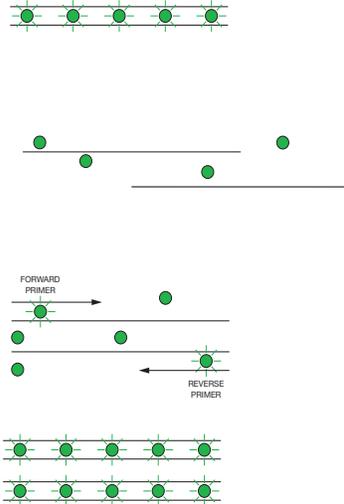
## Auswahl des geeigneten Reagenzientyps

TaqMan- und SYBR Green-Reagenzien können für die im Folgenden aufgelisteten Analysetypen verwendet werden.

| Reagenzientyp          | Analysetyp                   |                             |                              |
|------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|                        | Quantifizierung‡ (Kapitel 3) | Genotypisierung (Kapitel 4) | Positiv-/Negativ (Kapitel 5) |
| SYBR® Green-Reagenzien | Ja                           | nicht empfohlen             | nicht empfohlen              |
| TaqMan®-Reagenzien     | Ja                           | Ja                          | Ja                           |

‡ einschließlich Standardkurven-, relative Standardkurven- und vergleichende C<sub>T</sub>-Analysen

**Zu beachten:** Quantifizierungsanalysen können entweder mit TaqMan- oder mit SYBR Green-Reagenzien durchgeführt werden. Folgende Hinweise sollten bei der Auswahl eines Reagenzientyps beachtet werden:

| Reagenzientyp  | Verfahren   |
|--|---|
| <p><b>TaqMan®-Reagenzien oder Kits</b></p> <p><b>Beschreibung</b></p> <p>TaqMan-Reagenzien verwenden eine fluorogene Sonde zur Detektion eines spezifischen PCR-Produkts, während es in PCR-Zyklen vervielfältigt wird.</p> <p><b>Vorteile</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erhöht die Spezifität mithilfe einer Sonde. Eine spezifische Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz generiert das Fluoreszenzsignal.</li> <li>• Bietet Multiplex-Möglichkeiten</li> <li>• Gebrauchsfertige Assays sind verfügbar, die für die universellen Thermocycle-Bedingungen optimiert wurden.</li> <li>• Kann sowohl bei 1- als auch bei 2-Schritt-RT-PCR eingesetzt werden.</li> </ul> <p><b>Einschränkungen</b></p> <p>Erfordert die Synthese einer spezifischen Sonde.</p>  | <p><b>PCR und Detektion von cDNA</b></p>  <p><b>LEGENDE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>PP Zufalls-Primer</li> <li>F FAM™-Farbstoff</li> <li>Q Quencher</li> <li>MGB Minor Groove Binder</li> <li>AmpliTaq Gold® DNA Polymerase</li> <li>Sonde</li> <li>Primer</li> <li>Template</li> <li>Erweiterter Primer</li> </ul>  |
| <p><b>SYBR® Green-Reagenzien</b></p> <p><b>Beschreibung</b></p> <p>SYBR Green-Reagenzien verwenden SYBR® Green I-Farbstoff, einen Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet, um PCR-Produkte während ihrer Akkumulation in den PCR-Zyklen zu detektieren.</p> <p><b>Vorteile</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wirtschaftlich (es wird keine Sonde benötigt)</li> <li>• Ermöglicht eine Schmelzkurvenanalyse, um die Schmelztemperaturen aller PCR-Produkte messen zu können.</li> <li>• Kann sowohl bei 1- als auch 2-Schritt-RT-PC eingesetzt werden</li> </ul> <p><b>Einschränkungen</b></p> <p>Bindet unspezifisch an alle doppelsträngigen DNA-Sequenzen. Prüfen Sie zur Vermeidung von falsch positiven Signalen anhand einer Schmelzkurven- oder Gelanalyse, ob unspezifische Produktformationen vorliegen.</p> |  <p><b>Schritt 1: Reaktionsbeginn</b><br/>Der SYBR® Green 1-Farbstoff fluoresziert, wenn er doppelsträngige DNA bindet.</p> <p><b>Schritt 2: Denaturierung</b><br/>Wenn die DNA denaturiert ist, wird der SYBR® Green 1-Farbstoff freigesetzt und die Fluoreszenz wird drastisch reduziert.</p> <p><b>Schritt 3: Polymerisation</b><br/>Während der Extension lagern sich Primer an und das PCR-Produkt entsteht.</p> <p><b>Schritt 4: Polymerisation abgeschlossen</b><br/>Der SYBR® Green 1-Farbstoff bindet an das doppelsträngige Produkt, wodurch es zu einem Nettoanstieg der Fluoreszenz kommt.</p> |

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher für das StepOne-System ab.

## Minimieren von DNA-Kontaminationen

Die Fähigkeit der PCR zur DNA-Verfielfältigung macht spezielle Laborpraktiken erforderlich, wenn Sie Experimente mit TaqMan- oder SYBR Green-Reagenzien durchführen. DNA-Kontaminationen können durch Proben mit hoher DNA-Konzentration entstehen, entweder durch Positiv-Kontrollen oder durch PCR-Carryover.

Außerdem wird durch die Unspezifität des Farbstoffs SYBR Green I jede doppelsträngige DNA nachgewiesen. Deshalb sollte bei der Verwendung von SYBR Green-Reagenzien anhand einer Schmelzkurven- oder Gelanalyse geprüft werden, ob unspezifische Produktformationen vorliegen. Eine Kontamination mit der DNA-Zielsequenz muss sorgfältig vermieden werden. Genexpressionsassays, die Exon-Exon-Grenzen überschreiten, minimieren die Folgen von gDNA (genomische DNA)-Kontaminationen.

### UNG zur Vermeidung der Reamplifikation von Carryover-Produkten

AmpErase<sup>®</sup> Uracil N-Glycosylase (UNG) ist ein vom *Escherichia coli*-Uracil-N-Glycosylase-Gen kodiertes, rekombinantes 26-kDa-Enzym. Das Gen wurde in einen *E. coli*-Wirt eingesetzt, um die Expression der nativen Form des Enzyms zu steuern (Kwok and Higuchi, 1989).

UNG wirkt bei einzel- und doppelsträngiger, dU-enthaltender DNA, indem es die Uracil-glycosidischen Bindungen in dU-enthaltenden DNA-Abschnitten hydrolysiert. Das Enzym bewirkt die Freisetzung von Uracil und schafft somit eine alkali-sensitive, apyrimidinische Stelle in der DNA. Das Enzym besitzt keine Aktivität bei RNA oder dT-enthaltender DNA (Longo *et al.*, 1990).

### TaqMan-Assays

In TaqMan<sup>®</sup>-Assays kann eine Behandlung mit AmpErase<sup>®</sup> UNG die Reamplifikation von Carryover-Produkten aus vorhergehenden PCR-Reaktionen verhindern. Wird dTTP durch dUTP während der PCR-Amplifikation ersetzt, können durch eine Behandlung mit AmpErase UNG bis zu 200.000 Kopien des Amplikons pro 50- $\mu$ l-Reaktion entfernt werden.

**Hinweis:** TaqMan<sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix ist mit oder ohne AmpErase UNG erhältlich. Bei einer Verwendung von TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase<sup>®</sup> UNG, muss AmpErase UNG separat erworben werden.

### Assays mit SYBR Green I-Farbstoff

In Assays mit dem SYBR Green I-Farbstoff kann eine Behandlung mit AmpErase UNG die Reamplifikation von Carryover-Produkten aus vorhergehenden PCR-Reaktionen verhindern. Obwohl *Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix* und *SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix* keine AmpErase UNG enthalten, verfügen Sie über dUTP und sind somit mit AmpErase UNG kompatibel. Falls eine Kontamination mit einem Carryover-Produkt vermutet wird, sollte für die Fehlerbehebung AmpErase UNG verwendet werden.

**Hinweis:** AmpErase UNG kann separat oder als Teil des SYBR<sup>®</sup> Green PCR Core Reagents-Kits erworben werden.

## Allgemeine PCR-Praktiken

Zur Minimierung von Probenkontamination und PCR-Carryovers sollten folgende Maßnahmen getroffen werden:

- Tragen Sie einen sauberen Laborkittel, (der nicht bereits im Vorfeld bei der Behandlung amplifizierter PCR-Produkte oder während der Probenvorbereitung getragen wurde), sowie saubere Handschuhe bei der Vorbereitung der Proben für die PCR-Amplifikation. Die Handschuhe sollten bei jedem Verdacht auf eine Kontamination gewechselt werden.
- Die folgenden Arbeitsschritte sollten nur in speziellen Räumen mit hierfür vorgesehenen Instrumenten und Materialien durchgeführt werden:
  - Probenvorbereitung
  - Vorbereitung der PCR. Bereits amplifizierte PCR-Produkte dürfen niemals in den Arbeitsbereich für die Vorbereitung der PCR gebracht werden
  - PCR-Amplifikation
  - Analyse der PCR-Produkte
- Alle Reaktionsgefäße sollten vorsichtig geöffnet und geschlossen werden. Ein Verschütten oder Versprühen von PCR-Proben muss vermieden werden.
- Es sollten Pipetten mit Verdrängungs- bzw. Luftverdrängungsmechanismus und Pipettenspitzen mit Abschlussfilter verwendet werden. Die Pipettenspitze sollte nach jeder Verwendung ausgewechselt werden.
- Alle Reagenzien und Komponenten sollten soweit wie möglich verschlossen aufbewahrt werden.
- Labortische und Zubehör sollten in regelmäßigen Abständen mit einer 10%igen Bleichlösung oder 70%igem Ethanol gereinigt werden.

# Quantifizierungsanalysen

---

# 3

Dieses Kapitel umfasst die folgenden Themen:

Abschnitt 3.1 Informationen zu Quantifizierungsanalysen . . . . 3-3

Abschnitt 3.2 Design-Hinweise . . . . . 3-17



## Abschnitt 3.1 Informationen zu Quantifizierungsanalysen

---

Dieser Abschnitt umfasst die folgenden Themen:

|  |      |
|--|------|
| Überblick .....  | 3-4  |
| Auswahl einer Quantifizierungsmethode .....            | 3-5  |
| Auswahl zwischen 1-Schritt- und 2-Schritt-RT-PCR ..... | 3-8  |
| Auswahl von Singleplex- oder Multiplex-PCR .....       | 3-10 |
| Auswahl des Reagenzientyps .....                       | 3-13 |
| Auswahl des Assay-Typs .....                           | 3-13 |

## Überblick

### Was ist eine Quantifizierungsanalyse?

Eine Quantifizierungsanalyse ist ein Real-Time Experiment zur quantitativen Messung einer Zielnukleinsäuresequenz (Zielsequenz) in jedem Amplifikationszyklus der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Zielsequenz kann DNA, cDNA oder RNA sein.

In diesem Handbuch werden drei verschiedene Quantifizierungsanalysen vorgestellt:

- Standardkurve (Seite 3-5)
- Relative Standardkurve (Seite 3-5)
- Vergleichende  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) (Seite 3-6)

### Funktionsweise von Quantifizierungsanalysen

In Real-Time-Quantifizierungsanalysen werden die Reaktionen durch den Zeitpunkt innerhalb der Zyklusphase charakterisiert, an dem die Amplifikation eines PCR-Produkts ein definiertes konstantes Fluoreszenzniveau erreicht hat, und nicht über die endgültige, nach einer festen Zykluszahl entstandene PCR-Produktmenge. Eine Amplifikationsdarstellung stellt graphisch die gemessene Fluoreszenz über der Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen dar.

In den ersten PCR-Zyklen ist keine signifikante Änderung des Fluoreszenzsignals festzustellen. Diese vordefinierte PCR-Zykluszahl wird als *Grundlinie (Baseline)* bezeichnet. Zuerst generiert die Software einen Grundlinien-subtrahierten Amplifikationsplot, in dem der mathematische Trend des normalisierten Reporter-Fluoreszenzsignals berechnet wird (die mit den Grundlinienzyklen korrespondierenden  $R_n$ -Werte). Dann sucht ein Algorithmus nach dem Zeitpunkt der Amplifikationskurve, an dem das grundlinienkorrigierte und normalisierte Fluoreszenz-Reportersignal (Delta  $R_n$  [ $\Delta R_n$ ]-Wert) den Schwellenwert überschreitet. Der fraktionelle Zyklus, in dem der  $\Delta R_n$ -Wert den Schwellenwert überschreitet, wird als  $C_T$  definiert.

### Arbeitsablauf

Vor der Durchführung von Quantifizierungsanalysen auf dem Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System bereiten Sie die Analyse folgendermaßen vor:

1. Wählen Sie eine Quantifizierungsmethode (Seite 3-5).
2. Wählen Sie 1-Schritt- oder 2-Schritt-RT-PCR (Seite 3-8).
3. Wählen Sie zwischen Singleplex- und Multiplex-PCR-Reaktionen (Seite 3-10).
4. Wählen Sie den Reagenzientyp aus (Seite 3-13).
5. Wählen Sie den Assay-Typ aus (Seite 3-13).
6. Prüfen Sie die Design-Hinweise für den ausgewählten Assay-Typ (Abschnitt 3.2 auf Seite 3-17).

## Auswahl einer Quantifizierungsmethode

### Informationen zu Standardkurven-Analysen

In Standardkurven-Analysen wird die absolute Menge der Zielsequenz in einer Probe bestimmt. Zur Ermittlung der Ergebnisse wird eine Standardkurve verwendet, die aus einer Verdünnungsreihe mit bekannter Quantität erstellt wird.

#### Komponenten

PCR-Reaktionen für Standardkurven-Analysen enthalten die folgenden Komponenten:

- **Probe:** Proben, in denen die Menge der Zielsequenz unbekannt ist
- **Standard:** Eine Probe mit bekannter Quantität
- **Standardverdünnungsreihe:** Eine Reihe von Verdünnungen des Standards (zum Beispiel 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32), die zur Erstellung einer Standardkurve verwendet werden.
- **Replikate:** identische Reaktionen mit identischen Komponenten und Volumina
- **Negativkontrollen:** Proben, die statt Template Wasser oder Puffer enthalten und auch als No Template Control (NTC) bezeichnet werden. Negativkontrollen sollten nicht amplifiziert werden.

### Informationen zu relativen Standardkurven-Analysen

In relativen Standardkurven-Analysen wird die Expressionsänderung einer Zielsequenz in einer Probe relativ zur gleichen Zielsequenz in einer Referenzprobe bestimmt. Zur Ermittlung der Ergebnisse wird eine Standardkurve verwendet, die aus einer Verdünnungsreihe mit bekannter Quantität erstellt wird.

Relative Standardkurven-Analysen werden normalerweise für folgende Zwecke verwendet:

- Vergleich des Expressionsniveaus eines Gens in verschiedenen Geweben
- Vergleich des Expressionsniveaus eines Gens in einer behandelten Probe und in einer unbehandelten Probe
- Vergleich des Expressionsniveaus von Wildtyp- und mutierten Allelen

#### Komponenten

PCR-Reaktionen für relative Standardkurven-Analysen enthalten die folgenden Komponenten:

- **Probe:** Proben, in denen die Menge an Zielsequenz unbekannt ist
- **Referenzprobe:** die Probe, die als Basis zum Vergleich der Ergebnisse verwendet wird. Zum Beispiel würde sich in einer Studie über den Einfluss eines Medikaments auf die Genexpression eine unbehandelte Kontrolle als Referenzprobe eignen.
- **Standard:** Eine Probe mit bekannter Quantität
- **Standardverdünnungsreihe:** Eine Reihe von Verdünnungen des Standards (zum Beispiel 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32), die zur Erstellung einer Standardkurve verwendet werden. Die Menge der Zielsequenz wird in allen Proben durch Interpolation von der Standardkurve und die anschließende Division durch die Zielsequenzmenge der Referenzprobe ermittelt. Da die Referenzprobe als der

1X-Wert gesetzt wird, werden alle anderen Mengen als ein  $n$ -facher Unterschied Differenz relativ zu ihr ausgedrückt. Außerdem wird die Einheitsangabe der Standardkurve nicht bei den Berechnungen berücksichtigt, weil die Probenmenge durch die Menge der Referenzprobe dividiert wird. Folglich müssen von den Standards nur die relativen Verdünnungen bekannt sein. Jede Stamm-cDNA, -RNA oder -DNA mit der entsprechenden Zielsequenz kann somit zum Ansetzen von Standards verwendet werden.

- **Endogene Kontrolle:** ein Gen mit konstantem Expressionsniveau in allen Proben. Mithilfe der endogenen Kontrolle können Schwankungen, die durch ungenaues Pipettieren der cDNA zu jeder Reaktion entstanden sind, normalisiert werden.
- **Replikate:** identische Reaktionen mit identischen Komponenten und Volumina
- **Negativkontrollen:** Proben, die statt Template Wasser oder Puffer enthalten und auch als No Template Control (NTC) bezeichnet werden. Negativkontrollen sollten nicht amplifiziert werden.

### Informationen über vergleichende $C_T$ -Analysen

In vergleichenden  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )-Analysen wird die Expressionsänderung einer Zielsequenz in einer Probe relativ zur gleichen Zielsequenz in einer Referenzprobe bestimmt. Die Ergebnisse werden durch eine arithmetische Formel ermittelt (siehe „Formel für vergleichende  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )-Analysen“ auf Seite A-1).

Vergleichende  $C_T$ -Analysen werden normalerweise für folgende Zwecke verwendet:

- Vergleich des Expressionsniveaus eines Gens in verschiedenen Geweben
- Vergleich des Expressionsniveaus eines Gens in einer behandelten Probe und in einer unbehandelten Probe
- Vergleich des Expressionsniveaus von Wildtyp- und mutierten Allelen

### Komponenten

PCR-Reaktionen für vergleichende  $C_T$ -Analysen enthalten die folgenden Komponenten:

- **Probe:** Proben, in denen die Menge an Zielsequenz unbekannt ist
- **Referenzprobe:** die Probe, die als Basis zum Vergleich der Ergebnisse verwendet wird. Zum Beispiel würde sich in einer Studie über den Einfluss eines Medikaments auf die Genexpression eine unbehandelte Kontrolle als Referenzprobe eignen.
- **Endogene Kontrolle:** ein Gen mit konstantem Expressionsniveau in allen Proben. Mithilfe der endogenen Kontrolle können Schwankungen, die durch ungenaues Pipettieren der cDNA zu jeder Reaktion entstanden sind, normalisiert werden.
- **Replikate:** identische Reaktionen mit identischen Komponenten und Volumina
- **Negativkontrollen:** Proben, die statt Template Wasser oder Puffer enthalten und auch als No Template Control (NTC) bezeichnet werden. Negativkontrollen sollten nicht amplifiziert werden.

## Vergleich der Quantifizierungsmethoden

Beachten Sie bei der Wahl zwischen Standardkurven-, relativer Standardkurven- und vergleichender  $C_T$ -Analyse Folgendes:

| Analysetyp                                 | Beschreibung  | Vorteil  | Einschränkung   |
|--|---|--|---|
| Standardkurve                              | Verwendet eine Standardkurve zur Ermittlung der absoluten Menge einer Zielsequenz in einer Probe. Wird z. B. zur Quantifizierung der Viruslast verwendet.   | Ermöglicht Vergleiche mit bekannten Standardmengen.  | Da für jede Zielsequenz eine Standardkurve zu erstellen ist, werden mehr Reagenzien und Platz in der Reaktionsplatte benötigt.  |
| Relative Standardkurve                     | Verwendet eine Standardkurve zur Bestimmung der Expressionsänderung einer Zielsequenz in einer Probe relativ zur gleichen Zielsequenz in einer Referenzprobe. Am besten für Assays mit suboptimaler PCR-Effizienz geeignet.   | Benötigt am wenigsten Validierung, weil die PCR-Effizienzen der Zielsequenz und der endogenen Kontrolle nicht äquivalent sein müssen.  | Da für jede Zielsequenz eine Standardkurve zu erstellen ist, werden mehr Reagenzien und Platz in der Reaktionsplatte benötigt.  |
| Vergleichende $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ ) | Verwendet arithmetische Formeln zur Bestimmung der Expressionsänderung einer Zielsequenz in einer Probe relativ zur gleichen Zielsequenz in einer Referenzprobe. Am besten für Hochdurchsatzanalysen der relativen Genexpression mehrerer Gene in vielen Proben geeignet. | <ul style="list-style-type: none"> <li>Die relativen Zielsequenzniveaus in Proben können ohne Standardkurve bestimmt werden, wenn die PCR-Effizienzen der Zielsequenz und der endogenen Kontrolle in etwa gleich sind.</li> <li>geringerer Reagenzienverbrauch</li> <li>mehr Platz in der Reaktionsplatte verfügbar</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Suboptimale Assays (mit niedriger PCR-Effizienz) können ungenaue Ergebnisse liefern.</li> <li>Applied Biosystems empfiehlt, dass Sie vor Verwendung der vergleichenden <math>C_T</math>-Methode sicherstellen, dass die PCR-Effizienzen für den Zielsequenz-Assay und den endogenen Kontroll-Assay in etwa gleich sind.</li> </ul> |

### Weitere Informationen

Weitere Informationen über Quantifizierungsmethoden finden Sie im *User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression* (Relative Quantifizierung der Genexpression).

## Auswahl zwischen 1-Schritt- und 2-Schritt-RT-PCR

Die Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wird zur Quantifizierung von RNA verwendet. Eine RT-PCR kann als 1-Schritt- oder 2-Schritt-Verfahren ausgeführt werden.

### Informationen zur 1-Schritt-RT-PCR

In der 1-Schritt-RT-PCR werden reverse Transkription und PCR in nur einem Puffersystem ausgeführt (Abbildung 3-1). Die Reaktion läuft ohne die Zugabe von Reagenzien zwischen den RT- und PCR-Schritten ab. Die 1-Schritt-RT-PCR hat den Vorteil, dass für die RT- und PCR-Amplifikation nur ein Reaktionsgefäß vorzubereiten ist. Sie können bei der Durchführung einer 1-Schritt-RT-PCR jedoch nicht das Enzym zur Vorbeugung von Carryover-Kontaminationen, AmpErase<sup>®</sup> Uracil-N-Glycosylase (UNG), verwenden. In einer 1-Schritt-RT-PCR würde das Vorhandensein von UNG die cDNA bei ihrer Entstehung zerstören. Weitere Informationen zu UNG siehe „UNG zur Vermeidung der Reamplifikation von Carryover-Produkten“ auf Seite 2-7.

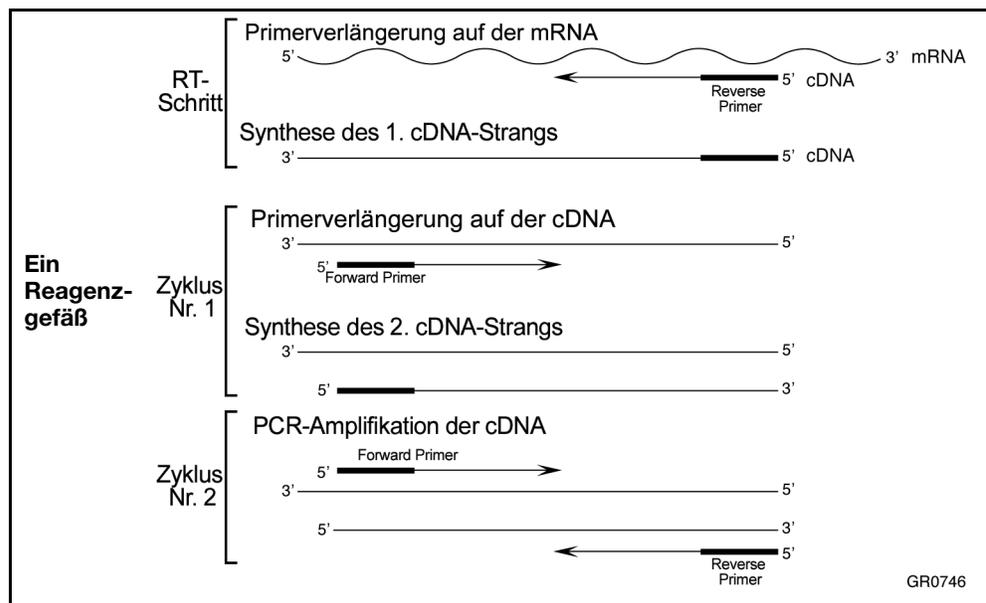


Abbildung 3-1 Schematische Darstellung einer 1-Schritt-RT-PCR

### Informationen zur 2-Schritt-RT-PCR

Die 2-Schritt-RT-PCR wird in zwei getrennten Reaktionen ausgeführt: einer RT- und einer PCR-Reaktion (Abbildung 3-2). Die 2-Schritt-RT-PCR ist für die Detektion multipler Transkripte von einer einzigen cDNA-Reaktion oder für die Speicherung eines Teils der cDNA zur späteren Verwendung sinnvoll. Wenn Sie dUTP als eine der Basen für die Durchführung einer PCR verwenden, können Sie das AmpErase<sup>®</sup> UNG-Enzym zur Vorbeugung von Carryover-Kontaminationen verwenden. Weitere Informationen zu UNG siehe „UNG zur Vermeidung der Reamplifikation von Carryover-Produkten“ auf Seite 2-7.

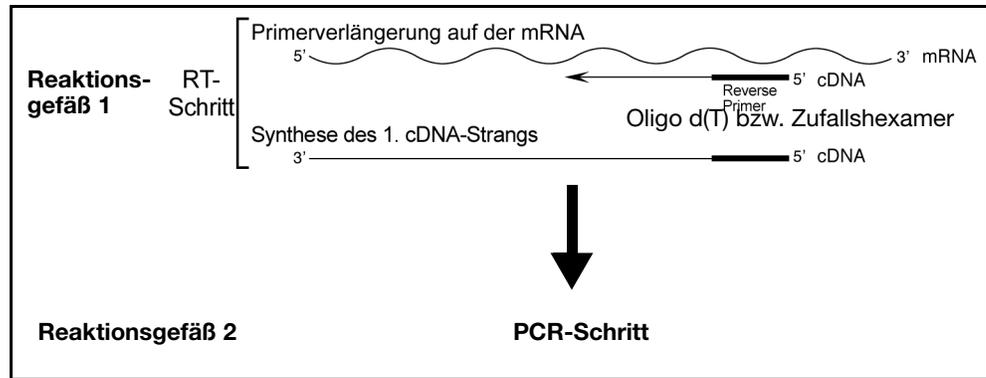


Abbildung 3-2 Schematische Darstellung einer 2-Schritt-RT-PCR

### Primer zur cDNA-Synthese

Bei der 1-Schritt-RT-PCR können sequenzspezifische reverse Primer für die cDNA-Synthese verwendet werden.

Bei der 2-Schritt-RT-PCR können die folgenden Primer für die cDNA-Synthese verwendet werden:

- Oligo d(T)<sub>16</sub>
- Zufalls-Primer
- Sequenzspezifische reverse Primer

Die Primer für die reverse Transkription werden am besten nach der experimentellen Auswertung aller drei Primersysteme ausgewählt. Für kurze RNA-Sequenzen ohne Haarnadelschleifen sind alle drei Primersysteme gleich gut geeignet. Für längere RNA-Transkripte oder -Sequenzen mit Haarnadelschleifen beachten Sie bitte die folgenden Hinweise:

| Primer                            | Auswahlhinweise   |
|-----------------------------------|---|
| Oligo d(T) <sub>16</sub>          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ist nur zur reversen Transkription von eukaryotischen mRNAs und Retroviren mit Poly-A-Schwänzen zu verwenden.</li> <li>• Lange mRNA-Transkripte oder Amplikons, die sich mehr als 2 Kilobasen über den Poly-A-Schwanz hinaus erstrecken, sind zu vermeiden.</li> </ul> |
| Zufalls-Primer                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Erste Option bei langen reversen Transkripten oder reversen Transkripten mit Haarnadelschleifen</li> <li>• Wird zur Transkription aller RNA (rRNA, mRNA und tRNA) verwendet.</li> </ul>  |
| Sequenzspezifische reverse Primer | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ist nur zur reversen Transkription von RNA-enthaltenden komplementären Sequenzen zu verwenden.</li> <li>• Wird bei der 1-Schritt-RT-PCR verwendet.</li> </ul>  |

**Vergleich von RT-PCR-Methoden**

| Methoden         | Primer für die cDNA-Synthese      | Anmerkungen  |
|------------------|-----------------------------------|--|
| 1-Schritt-RT-PCR | Sequenzspezifische reverse Primer | benötigt nur einen Reaktionsmix<br>AmpErase® UNG kann nicht verwendet werden                   |
| 2-Schritt-RT-PCR | Zufallshexamere                   | cDNA kann zur späteren Verwendung gelagert werden<br>AmpErase® UNG kann nicht verwendet werden |
|                  | Oligo d(T) <sub>16</sub>          |  |
|                  | Sequenzspezifische reverse Primer | benötigt zwei Reaktionsmische  |

## Auswahl von Singleplex- oder Multiplex-PCR

Sie können zwei Arten von PCR-Reaktionen durchführen:

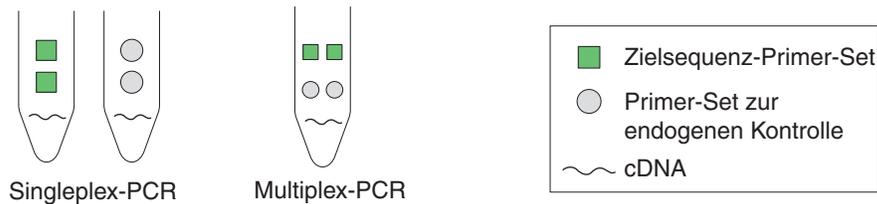
- **Singleplex-PCR:** Für Standardkurven-, relative Standardkurven- und vergleichende C<sub>T</sub>-Analysen. In einer Singleplex-PCR ist im Reaktionsröhrchen oder Well nur ein Primerset vorhanden. Pro Reaktion kann nur eine Zielsequenz oder endogene Kontrolle amplifiziert werden.

oder

- **Multiplex-PCR:** Für vergleichende C<sub>T</sub>-Analysen. In einer Multiplex-PCR sind zwei oder mehr Primersets im Reaktionsröhrchen oder Well vorhanden. Jedes Set amplifiziert eine bestimmte Zielsequenz oder endogene Kontrolle. Normalerweise wird eine mit FAM<sup>TM</sup>-Farbstoff markierte Sonde für die Detektion der Zielsequenz und eine mit VIC<sup>®</sup>-Farbstoff markierte Sonde zur Detektion der endogenen Kontrolle verwendet.

**WICHTIG!** SYBR<sup>®</sup> Green-Reagenzien können nicht für Multiplex-PCR verwendet werden.

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA<sup>TM</sup>-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.



## Multiplex-PCR für vergleichende $C_T$ Analysen

Zur Durchführung einer Multiplex-PCR für vergleichende  $C_T$ -Analysen gehen Sie folgendermaßen vor:

- Vergewissern Sie sich, dass die von Ihnen gewählte endogene Kontrolle in höherer Abundanz (niedrigerer  $C_T$ ) als die Zielsequenzen vorliegt, die Sie quantifizieren möchten.
- Führen Sie den endogenen Kontroll-Assay als primer-limitierten Assay aus. Der endogene Kontroll-Assay (für das Template mit höherer Abundanz) in jeder Reaktion muss primer-limitiert sein, um eine kompetitive PCR zu verhindern, die den  $C_T$ -Wert des Templates mit geringerer Abundanz verändern könnten.

### Primer-Limitierung in der Multiplex-PCR

Zur Erstellung eines exakten Multiplex-Assays ist es wichtig, dass die Amplifikation einer Spezies nicht die der anderen dominiert. Ansonsten kann die Amplifikation einer sehr abundanten Spezies eine effiziente Amplifikation der weniger abundanten Spezies verhindern.

Wenn die weniger abundante Spezies nicht effizient amplifiziert wird, kann die Analyse ungenaue Ergebnisse liefern oder in schweren Fällen auch die Detektion von weniger abundanten Spezies ganz verhindern. Sie können diese Situation durch eine Limitierung der für die Amplifikation der abundanten Spezies verwendeten Primerkonzentrationen vermeiden. Dadurch wird die Amplifikation kurz nach Erfassung des  $C_T$ -Werts „ausgeschaltet“. Jedoch kann ein primer-limitierter Assay anfälliger für Fluktuationen der Reaktionsbedingungen sein, als der Zielsequenz-Assay mit unlimitiertem Primer, den er normalisiert. Weitere Informationen finden Sie unter Anhang B, „Primer-Limitierung in Multiplex-PCR.“.

### Singleplex- im Vergleich zu Multiplex-PCR

Eine Primer-Limitierung in der Multiplex-PCR wird immer komplexer, je mehr Zielsequenzen quantifiziert werden sollen. Bei der Analyse von mehreren Zielsequenzen kann die Verwendung einer Singleplex-PCR aus den folgenden Gründen effektiver sein:

- Bei einer Multiplex-PCR kann es schwierig sein, eine geeignete endogene Kontrolle mit den folgenden Merkmalen zu finden:
  - liegt in höherer Abundanz als alle zu quantifizierenden Zielsequenzen vor
  - verändert nicht die Expressionsniveaus bei den Versuchsbedingungen oder über verschiedene Proben hinweg

Sie müssten zuerst alle Zielsequenz- und endogenen Kontroll-Assays sowohl in Multiplex- als auch in Singleplex-Formaten durchführen und dann die  $C_T$ -Werte beider Formate vergleichen, um festzustellen, ob sich das Multiplexing auf Ihre  $C_T$ -Werte in irgendeiner Weise auswirkt.

- Bei einer Singleplex-PCR kann jede Zielsequenz, deren Expressionsniveau unter Versuchsbedingungen oder über Proben hinweg unverändert bleibt, als endogene Kontrolle dienen. Je mehr Zielsequenzen Sie in einem Singleplex-Format haben, desto höher ist deshalb die Wahrscheinlichkeit, mindestens eine geeignete endogene Kontrolle zu haben, gegen die Sie die übrigen Zielsequenzen normalisieren können.

Beachten Sie bei der Wahl zwischen Multiplex- und Singleplex-PCR für vergleichende C<sub>T</sub>-Analysen Folgendes:

| PCR        | Beschreibung   | Vorteil  | Einschränkung   |
|------------|--|--|---|
| Singleplex | Eine Reaktion, in der nur eine Zielsequenz oder endogene Kontrolle im Reaktionsgefäß oder Well amplifiziert wird.      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Für TaqMan<sup>®</sup>-Assays ist keine Optimierung erforderlich.</li> <li>• Jede Zielsequenz, die ihre Expressionsniveaus unter Versuchsbedingungen oder über Proben hinweg nicht ändert, kann als endogene Kontrolle dienen.</li> <li>• Sowohl TaqMan<sup>®</sup>- als auch SYBR<sup>®</sup> Green-Reagenzien können verwendet werden.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Benötigt Probenmaterial sowohl für die Zielsequenz als auch für die endogene Kontrolle.</li> </ul>   |
| Multiplex  | Eine Reaktion, in der mehr als eine Zielsequenz oder endogene Kontrolle im Reaktionsgefäß oder Well amplifiziert wird. | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verringert sowohl die Betriebskosten als auch die Abhängigkeit von akkurater Pipettierung beim Aufteilen einer Probe in zwei verschiedene Rörchen.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Der endogene Kontroll-Assay ist als primer-limitierter Assay auszuführen.</li> <li>• Validierung und Optimierung sind erforderlich.</li> <li>• Ist eventuell nicht so effektiv wie eine Singleplex-PCR bei der Analyse von mehreren Zielsequenzen.</li> <li>• Sie können SYBR<sup>®</sup> Green-Reagenzien nicht verwenden.</li> </ul> |

## Auswahl des Reagenzientyps

### TaqMan- im Vergleich mit SYBR Green-Reagenzien

Sie können für die Durchführung von Quantifizierungsanalysen mit dem StepOne-System die folgenden Reagenzien verwenden:

- TaqMan<sup>®</sup>-Reagenzien
- SYBR<sup>®</sup> Green-Reagenzien

Weitere Informationen über die Wahl zwischen TaqMan- und SYBR Green-Reagenzien siehe „Zu beachten: Quantifizierungs- analysen“ auf Seite 2-6.

## Auswahl des Assay-Typs

Bei der Einrichtung Ihres Analysedesigns mit der StepOne-Software können Sie zwischen den folgenden Assay-Typen für Quantifizierungsanalysen wählen:

- Inventoried/Made to Order (Inventarisiert/Auf Bestellung, Seite 3-14)
- Custom, (Kundenspezifisch, Seite 3-15)

In diesem Abschnitt werden die für jeden Assay-Typ verfügbaren Produkte aufgelistet.

**Hinweis:** Die Assays sind für die jeweiligen Zielsequenzen spezifisch. Die Master-Mixe enthalten die übrigen für die PCR-Reaktion benötigten Komponenten.

**Assays  
Inventarisiert/  
Auf Bestellung**

| Produkt   | Eigenschaften  |
|---|--|
| TaqMan® Gene Expression Assays  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorentworfene, genspezifische Primer- und Sonden-Sets für Gene von Menschen, Mäusen, Ratten, <i>Arabidopsis</i>, <i>Drosophila</i>, <i>C. elegans</i>, <i>C. familiares</i> (Hund) und Rhesusaffen</li> <li>• Verfügbar im praktischen Ein-Röhrchen-Format als inventarisierte Assays oder als Assays auf Bestellung</li> </ul>         |
| TaqMan® Endogenous Control Assays<br><b>Hinweis:</b> TaqMan Endogenous Control Assays sind den inventarisierten TaqMan Gene Expression Assays beigruppiert. | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Optimierte, vorformulierte und gebrauchsfertige endogene Kontroll-Assays</li> <li>• Kostengünstige Genexpressionsquantifizierung für Menschen, Mäuse, Ratten, <i>Arabidopsis</i>, <i>Drosophila</i> und alle eukaryotischen Spezies</li> <li>• Auswahl an FAM™-Farbstoff- oder VIC®-Farbstoffmarkierungen (primer-limitiert)</li> </ul> |
| Custom TaqMan® Gene Expression Assays   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Für alle Spezies oder Organismen</li> <li>• Zielsequenz Ihrer Wahl</li> <li>• Praktisches Ein-Röhrchen-Format</li> </ul>  |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase® UNG)   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bietet eine optimale Leistung bei TaqMan®-Assays, die cDNA oder DNA als Template verwenden.</li> <li>• Enthält Komponenten zur Sicherstellung einer hervorragenden Assay Performance.</li> <li>• Die Verwendung eines Reagenz für alle Assays vereinfacht den Prozess der Assay-Implementierung</li> </ul>                              |
| TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bietet die gleichen Eigenschaften, die oben für den TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix aufgeführt wurden.</li> <li>• Ermöglicht die Durchführung von Quantifizierungsanalysen auf dem StepOne™-System in etwa 35 Minuten.</li> </ul>   |

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.

Hinweise zur Einrichtung Ihres Analysedesigns mit inventarisierten Assays oder Assays auf Bestellung finden Sie auf Seite 3-18.

## Eigene Assays

| Produkt   | Eigenschaften  |
|---|--|
| Custom TaqMan®-Sonden und -Primer                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>Für alle Spezies oder Organismen</li> <li>Auswahl an Farbstoffmarkierungen, Quenchern und Synthesemaßstäben</li> <li>In Verwendung mit der Primer Express®-Software und den Hinweisen zum Assay-Design von Applied Biosystems</li> </ul>  |
| Primer Express® Software  | Software für das Design von Primern und Sonden für Real-Time PCR   |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase® UNG) | <ul style="list-style-type: none"> <li>Bietet eine optimale Leistung bei TaqMan®-Assays, die cDNA oder DNA als Template verwenden.</li> <li>Enthält Komponenten zur Sicherstellung einer hervorragenden Assay Performance.</li> <li>Die Verwendung eines Reagenz für alle Assays vereinfacht den Prozess der Assay-Implementierung</li> </ul>  |
| TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Bietet die gleichen Eigenschaften, die oben für den TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix aufgeführt wurden.</li> <li>Ermöglicht die Durchführung von Quantifizierungsanalysen auf dem StepOne™-System in etwa 35 Minuten.</li> </ul>   |
| Power SYBR® Green PCR Master Mix                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Hochempfindliche Quantifizierung ermöglicht auch die Detektion von nur wenigen Kopien (schon ab zwei Kopien eines Zielgens).</li> <li>Detektiert doppelsträngige DNA, weshalb spezifische Sonden nicht benötigt werden.</li> <li>Enthält hoch gereinigte AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase LD zur Minimierung unspezifischer Produktbildung (einschließlich Primer-Dimer).</li> <li>In Verwendung mit der Primer Express®-Software und den Hinweisen zum Assay-Design von Applied Biosystems</li> </ul> |
| SYBR® Green PCR Master Mix  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Detektiert doppelsträngige DNA, weshalb spezifische Sonden nicht benötigt werden.</li> <li>Für Standardapplikationen, bei denen keine hohe Empfindlichkeit erforderlich ist.</li> <li>Enthält AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase LD zur Minimierung unspezifischer Produktbildung (einschließlich Primer-Dimer).</li> <li>In Verwendung mit der Primer Express®-Software und den Hinweisen zum Assay-Design von Applied Biosystems</li> </ul>  |

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.

Hinweise zur Einrichtung Ihres Analysedesigns für eigene Assays finden Sie auf Seite 3-22.



---

## Abschnitt 3.2 Design-Hinweise

---

Dieser Abschnitt umfasst die folgenden Themen:

|  |      |
|--|------|
| Assays Inventarisiert/Auf Bestellung .....                           | 3-18 |
| Inventarisierte TaqMan® Gene Expression Assays .....                 | 3-18 |
| Custom TaqMan® Gene Expression Assays .....                          | 3-20 |
| Auswahl des Master-Mixes .....                                       | 3-21 |
| Experimentelles Design .....   | 3-22 |
| Eigene Assays .....  | 3-22 |
| Entwerfen von Primern und Sonden mit der Primer Express®-Software .. | 3-23 |
| Auswahl der Reagenzien .....   | 3-26 |
| Empfohlene Thermocycling-Bedingungen .....                           | 3-28 |
| Optimieren der Primerkonzentrationen .....                           | 3-31 |
| Optimieren der Sondenkonzentration .....                             | 3-34 |
| Weitere Informationen .....  | 3-37 |

## Assays Inventarisiert/Auf Bestellung

**Arbeitsablauf** Bei Auswahl des Assay-Typs Inventarisiert/Auf Bestellung in der StepOne™-Software empfiehlt Applied Biosystems die Einhaltung des unten aufgeführten Arbeitsablaufs:

1. Wählen Sie den Assay aus:
  - TaqMan® Gene Expression Assays (unten)
  - Custom TaqMan® Gene Expression Assays (Seite 3-20).
2. Wählen Sie den Master-Mix aus (Seite 3-21).
3. Richten Sie das Analysedesign mit der StepOne-Software ein (Seite 3-22).

### Inventasierte TaqMan® Gene Expression Assays

**Produktbeschreibung** TaqMan® Gene Expression Assays sind eine umfassende Kollektion an inventarisierten und auf Bestellung erhältlichen Sonden- und Primersets zur Durchführung von Quantifizierungsanalysen an Genen von Menschen, Mäusen, Ratten, *Arabidopsis*, *Drosophila*, *C. elegans*, *C. familiares* (Hund) und Rhesusaffen.

Jeder Assay wird nach einem automatisierten Design und in einem qualitätskontrollierten Prozess erstellt. Inventarisierte Assays werden hergestellt und auf Lager gehalten, während Assays auf Bestellung vorentworfen und erst bei Bestellung hergestellt werden.

**Produkt-eigenschaften** Für alle TaqMan Gene Expression Assays gilt Folgendes:

- Sie benötigen drei Komponenten:
  - 1 bis 100 ng an cDNA-Probe (umgewandelt aus RNA) pro Well, wobei alle Wells in einer Studie die gleiche Menge an cDNA enthalten.
  - 20× Gene Expression Assay Mix (für jede Zielsequenz spezifisch). Jeder Assay-Mix besteht aus zwei unmarkierten PCR-Primern und einer mit FAM™-Farbstoff markierten TaqMan® MGB (Minor Groove Binder)-Sonde in einem gebrauchsfertigen 20×-Mix. 1×-Endkonzentrationen betragen 250 nM für die Sonde und 900 nM für jeden Primer.
  - TaqMan® Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase® UNG) oder TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG.
- Entwickelt und optimiert für den TaqMan®-Master-Mix und die Universellen Thermocycling-Bedingungen.
- Erfordern nur einen PCR-Amplifikationsschritt bei gleichzeitiger Real-Time Messung, um Ergebnisse zu erhalten.
- Amplifizieren Sie nach Möglichkeit Ziel-cDNA, ohne genomische DNA (*m*-Suffix in Assay-ID) zu amplifizieren, indem Sie Sonden entwerfen, die Exon-Exon-Grenzen überschreiten.

**Verfügbare Assays**

TaqMan Gene Expression Assays sind für die Gene von Menschen, Mäusen, Ratten, *Arabidopsis*, *Drosophila*, *C. elegans*, *C. familiares* (Hund) und Rhesusaffen verfügbar. Es gelten die folgenden Bestellnummern:

- BN 4331182 für inventarisierte Assays
- BN 4351372 für Assays auf Bestellung

Das Präfix des Assay-Namens gibt die Spezies an, für die der Assay entworfen wurde: *Hs* für *Homo sapiens* (Mensch), *Mm* für *Mus musculus* (Maus), *Rn* für *Rattus norvegicus* (Ratte), *At* für *Arabidopsis thaliana*, *Dm* für *Drosophila melanogaster*, *Ce* für *C. elegans*, *Cf* für *C. familiares* (Hund) und *Rh* für Rhesusaffe.

Das Suffix des Assay-Namens gibt entsprechend der unten stehenden Tabelle die Assay-Platzierung an.

| Suffix     | Beschreibung   |
|------------|--|
| <i>_m</i>  | Die Sonde des Assays überschreitet eine Exon-Grenze; das Assay detektiert keine genomische DNA.  |
| <i>_s</i>  | Die Primer und Sonden des Assays befinden sich innerhalb eines einzigen Exons; das Assay detektiert genomische DNA.  |
| <i>_g</i>  | Die Primer und Sonden des Assays befinden sich eventuell innerhalb eines einzigen Exons; das Assay detektiert eventuell genomische DNA.  |
| <i>_mH</i> | Der Assay wurde für ein Transkript einer Genfamilie mit hoher Sequenzhomologie entwickelt. Der Assay liefert einen Unterschied zwischen dem Zielgen und dem Gen mit der nächsten Sequenzhomologie von 10 C <sub>T</sub> bis 15 C <sub>T</sub> . Deswegen detektiert der Assay das Zieltranskript mit einer 1000- bis 3000-fach höheren Empfindlichkeit (Sensitivität) als das nächste homologe Transkript, wenn beide in gleicher Kopienzahl in einer Probe vorliegen. |
| <i>_sH</i> |  |
| <i>_gH</i> |  |
| <i>_u</i>  | Das Amplikon des Assays überschreitet eine Exon-Grenze und die Sonde befindet sich vollständig innerhalb eines der betreffenden Exons.   |

**TaqMan® Endogenous Control Assays**

TaqMan® Endogenous Control Assays sind mit den Inventorized TaqMan Gene Expression Assays (BN 4331182) gruppiert. TaqMan Endogenous Control Assays sind für die folgenden Zwecke verfügbar:

- Verfügbar als TaqMan Gene Expression Assay mit einer mit dem Farbstoff FAM<sup>™</sup> markierten TaqMan-MGB-Sonde als gebrauchsfertige Mischung in einem 20X-Röhrchen
- Entweder mit VIC<sup>®</sup>-Farbstoff markierte oder mit FAM<sup>™</sup>-Farbstoff markierte TaqMan MGB-Sonden für alle Spezies von Mensch, Maus und Ratte. TaqMan Endogenous Controls mit VIC-Farbstoff sind primer-limitiert.

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA<sup>™</sup>-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.

### Weitere Informationen

- Informationen über die neuesten verfügbaren Produkte und jeweiligen Produktverwendungen finden Sie auf der Website von Applied Biosystems:  
**<http://www.appliedbiosystems.com/>**
  - a. Wählen Sie auf der Website unter TaqMan® Products die Option **TaqMan® Gene Expression Assays**.
  - b. Wählen Sie auf der Seite Gene Expression Assays & Arrays unter Individual Assays (Einzelne Assays) die Option **TaqMan® Gene Expression Assays**.
- Informationen über Custom TaqMan Endogenous Control Assays finden Sie im Anwendungshinweis *Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies*.
- Informationen über das Ansetzen von PCR-Reaktionen mit den TaqMan Gene Expression Assays finden Sie im *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*.

## Custom TaqMan® Gene Expression Assays

### Produktbeschreibung

Custom TaqMan® Gene Expression Assays sind TaqMan-Sonden- und Primersets, die vom Custom TaqMan® Genomic Assays-Service aufgrund der vom Kunden bereitgestellten Sequenzinformationen entworfen, synthetisiert und formuliert werden. Mit Custom TaqMan Gene Expression Assays können Sie Quantifizierungsanalysen mit den Genen der Spleißvarianten aller Organismen durchführen.

Die Assays verwenden TaqMan-Reagenzien für die Amplifikation und den Nachweis der Zielsequenz in cDNA-Proben. Alle Assays wurden mithilfe einer firmeneigenen Assay-Design-Software entwickelt.

### Produkt-eigenschaften

Für alle Custom TaqMan Gene Expression Assays gilt Folgendes:

- Sie müssen einen „Submission File“ (mit der Freeware File Builder) mit Ihrer Zielsequenz erstellen und diese Datei beim Custom TaqMan Genomic Assays-Service einreichen.
- Sie benötigen drei Komponenten:
  - 1 bis 100 ng an cDNA-Probe (umgewandelt aus RNA) pro Well, wobei alle Wells in einer Studie die gleiche Menge an cDNA enthalten.
  - 20X Gene Expression Assay oder 60X Gene Expression Assay (spezifisch für die jeweilige Zielsequenz). Jeder Assay besteht aus zwei zielsequenzspezifischen Primern und einer mit FAM™-Farbstoff markierten TaqMan MGB-Sonde in einem gebrauchsfertigen 20-fachen oder 60-fachen Mix. 1X-Endkonzentrationen betragen 250 nM für die Sonde und 900 nM für jeden Primer.
  - TaqMan® Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase® UNG) oder TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG.
- Designed und optimiert für die Verwendung mit einem TaqMan-Master-Mix und den Universellen Thermocycling-Bedingungen
- Zur Lieferung von Ergebnissen ist nur ein PCR-Amplifikationsschritt bei gleichzeitiger Real-Time Messung erforderlich.

**Weitere Informationen**

- Informationen über die neuesten verfügbaren Produkte und jeweiligen Produktverwendungen finden Sie auf der Website von Applied Biosystems:  
**<http://www.appliedbiosystems.com/>**
  - a. Wählen Sie auf der Website unter TaqMan® Products die Option **TaqMan® Gene Expression Assays**.
  - b. Wählen Sie auf der Seite Gene Expression Assays & Arrays (Genexpressions-Assays und –Arrays) unter Individual Assays (Einzelne Assays) die Option **Custom TaqMan® Gene Expression Assays**.
- Informationen über die Bestellung von Custom TaqMan Gene Expression Assays finden Sie im *Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol: Submission Guidelines*.
- Informationen über das Ansetzen von PCR-Reaktionen mit den Custom TaqMan Gene Expression Assays finden Sie im *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*.

**Auswahl des Master-Mixes****Verfügbare Master-Mixe**

Inventarisierte oder auf Bestellung erhältliche Applied Biosystems-Assays für Quantifizierungsanalysen eignen sich zur Verwendung mit den folgenden TaqMan®-Master-Mixen:

| <b>Master-Mix</b>  | <b>Bestell-Nr.</b> |
|--|--------------------|
| TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG, 250 Reaktionen | 4352042            |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, 200 Reaktionen                          | 4304437            |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, 2000 Reaktionen                         | 4326708            |
| 10er-Packung, TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix                            | 4305719            |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 200 Reaktionen        | 4324018            |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 2000 Reaktionen       | 4326614            |
| 10er-Packung, TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG          | 4324020            |

**Weitere Informationen**

Informationen zur Verwendung von TaqMan-Reagenzien finden Sie in den folgenden Protokollen:

- *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) Protocol*
- *TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol*

## Experimentelles Design

**StepOne-Software verwenden** Verwenden Sie für inventarisierte oder auf Bestellung erhältliche Assays von Applied Biosystems die StepOne-Software zum Einrichten Ihrer Quantifizierungsanalysen. Die StepOne-Software berechnet automatisch die Mengen für die folgenden Mischungen:

- Reaktionsmix-Komponenten
- Probenverdünnungen
- *(Nur Standardkurven- und relative Standardkurvenanalysen)*  
Standardverdünnungsreihe

**Hinweis:** Um den Assay-Typ Inventarisiert/Auf Bestellung in der StepOne-Software auszuwählen, öffnen Sie im Bildschirm Reaction Setup (Reaktionseinrichtung) entweder den Design Wizard (Analysedesign-Assistent) oder den Arbeitsablauf Advanced Setup (Setup für Fortgeschrittene). Wählen Sie dann aus dem Dropdown-Menü Assay Type (Assay-Typ) die Option **Inventorized/Made to Order**.

**Weitere Informationen** Weitere Informationen über die Einrichtung und Durchführung von Quantifizierungsanalysen auf dem StepOne-System:

- *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Einführungshandbuch zu Standardkurven-Analysen*
- *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Einführungshandbuch zu relativen Standardkurven- und vergleichenden C<sub>T</sub>-Analysen*

## Eigene Assays

**Arbeitsablauf** Wenn Sie den kundenspezifischen Assay-Typ in der StepOne™-Software für eine Quantifizierungsanalyse wählen (d. h. wenn Sie Ihre eigenen Primer und Sonden erstellen), empfiehlt Applied Biosystems die Einhaltung des Arbeitsablaufes für die Applied Biosystems-Hinweise zum Assay-Design:

1. Entwerfen Sie Primer und Sonden mithilfe der Primer Express®-Software (siehe unten).
2. Wählen Sie den geeigneten Reagenzientyp aus (Seite 3-26).  
**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.
3. Verwenden Sie die empfohlenen Thermocycling-Bedingungen (Seite 3-28).
4. Beginnen Sie mit den Standardkonzentrationen für Primer und Sonden. Optimieren Sie bei Bedarf die Primerkonzentrationen (Seite 3-31) und Sondenkonzentrationen (Seite 3-34).

**WICHTIG!** Diese Schritte führen nur dann schnell und zuverlässig durch das Design und die Optimierung von Assays, wenn sie in ihrer Gesamtheit angewendet werden. Die höchste Erfolgsquote erzielen Sie beim Einhalten der gesamten Schrittfolge. Eine detaillierte Beschreibung der Applied Biosystems-Hinweise zum Assay-Design finden Sie in Anhang C.

**Hinweis:** Um den kundenspezifischen Assay-Typ in der StepOne-Software auszuwählen, öffnen Sie im Bildschirm Reaction Setup (Reaktionseinrichtung) entweder den Design Wizard (Analysedesign-Assistent) oder den Arbeitsablauf Advanced Setup (Setup für Fortgeschrittene), und wählen Sie anschließend aus dem Dropdown-Menü Assay Type (Assay-Typ) die Option **Custom** (Kundenspezifisch).

## Entwerfen von Primern und Sonden mit der Primer Express®-Software

Die Primer Express®-Software verwendet empfohlene Parameter, um in Abhängigkeit von der von Ihnen bereitgestellten DNA-Sequenz Primer und Sonden auszuwählen.

Wenn Sie Ihren eigenen Assay entwerfen, befolgen Sie die zusammengefassten Hinweise zum Primer- und Sonden-Design für Quantifizierungsanalysen auf Seite 3-25. Eine ausführliche Beschreibung dieser Hinweise finden Sie unter „Primer- und Sonden-Design Richtlinien“ auf Seite 3-24.

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.

**Hinweis:** Auch wenn für die Detektion mit SYBR® Green I-Farbstoff keine Sonde benötigt wird, ist die Verwendung der Primer Express-Software zur Auswahl eines Primer- und Sonden-Sets beim Design eines Assays für SYBR® Green-Reagenzien dennoch zu empfehlen. Selbst ohne die Verwendung einer Sonde erfüllen die Primer alle erforderlichen Kriterien; wenn Sie den Assay zur Erzielung einer höheren Spezifität auf TaqMan-Reagenzien umstellen müssen, können Sie die Sonde sofort im Originaldokument für die Primer Express-Software finden.

### Position des Amplikons für die Quantifizierung auswählen

Durch Auswahl einer guten Position für das Amplikon wird die Amplifikation der Ziel-mRNA/cDNA ohne eine gleichzeitige Amplifikation der genomischen Sequenz, von Pseudogenen und anderen verwandten Genen sichergestellt. SYBR Green-Reagenzien können für das Screening von Amplikon-Positionen für die Genexpression nützlich sein.

#### Hinweise

- Das Amplikon sollte sich über ein oder mehrere Intron/s erstrecken, um eine Amplifikation des Zielgens in genomischer DNA zu vermeiden.
- Das Primer-Paar sollte zielgenspezifisch sein, um eine Amplifikation von Pseudogenen oder anderen verwandten Genen zu verhindern.
- Führen Sie das Primer-Design anhand der Hinweise für die Primer Express-Software aus.
- Sollte keine gute Sequenz gefunden werden, könnte eine Untersuchung der Sequenz und ein Neuentwurf des Amplikons bzw. ein Screening nach weiteren Positionen erforderlich sein.

Wenn das von Ihnen untersuchte Gen keine Introns besitzt, kann kein Amplikon entworfen werden, das die mRNA-Sequenz ohne eine Amplifikation der genomischen Sequenz amplifiziert. Lassen Sie in diesem Fall eine Kontrolle Ihrer RNA-Probe mitlaufen, die nicht revers transkribiert wurde (RT-Minus-Kontrollen).

## Primer- und Sonden-Design Richtlinien

### Auswahl von kleinen Amplikons

Ein wichtiger Standardparameter der Primer Express-Software ist die Auswahl von Amplikons im Bereich von 50 bis 150 Basispaaren. Kleine Amplikons sind vorzuziehen, da Sie eine hoch effiziente Amplifikation unterstützen.

Außerdem ermöglichen hoch effiziente Assays eine Durchführung der relativen Quantifizierung mithilfe der vergleichenden  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )-Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Diese Methode steigert den Probendurchsatz, indem sie die Notwendigkeit von Standardkurven bei der Betrachtung der Expressionsniveaus einer Zielsequenz relativ zu einer Referenzprobe überflüssig macht.

### G/C-Gehalt

Wählen Sie nach Möglichkeit Primer und Sonden in einer Region mit einem G/C-Gehalt von 30 bis 80 % aus. Regionen mit einem G/C-Gehalt von >80 % denaturieren unter Umständen während der PCR nicht gut, wodurch die Effizienz der Reaktion verringert wird. G/C-reiche Sequenzen sind für unspezifische Interaktionen empfänglich, die die Reaktionseffizienz verringern und bei Assays, die SYBR Green-Reagenzien verwenden, unspezifische Signale produzieren können. Vermeiden Sie Primer- und Sondensequenzen mit vier oder mehr aufeinander folgenden G-Basen.

### Schmelztemperatur

Wenn Sie Primer und Sonden mit der empfohlenen Schmelztemperatur ( $T_m$ ) auswählen, können Sie die Universellen Thermocycling-Bedingungen verwenden. Applied Biosystems empfiehlt, dass die Schmelztemperatur der Sonden 10 °C über der Temperatur der Primer liegt.

### 5'-Ende der Sonden

Die Primer Express-Software wählt keine Sonden mit einem G am 5'-Ende. Der Quentscheffekt einer G-Base in dieser Position ist sogar nach einer Sondenspaltung vorhanden, was zu verringerten Fluoreszenzwerten führen kann ( $\Delta R_n$ ), die wiederum die Assay-Leistung verringern können. Für G-Basen, die sich nahe aber nicht direkt am 5'-Ende befinden, konnte keine Beeinträchtigung der Assay-Leistung nachgewiesen werden.

### 3'-Ende der Primer

Um die Möglichkeit von unspezifischer Produktformation zu verringern, sollten die letzten fünf Basen am 3'-Ende der Primer nicht mehr als zwei C- bzw. G-Basen enthalten. Unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. bei einer G/C-reichen Template-Sequenz, müssen Sie unter Umständen diese Empfehlung vernachlässigen, um die Länge des Amplikons unter 150 Basispaaren zu halten. Vermeiden Sie im Allgemeinen Primer mit 3'-Enden, die extrem G- bzw. C-basenreich sind.

**Zusammenfassung der Richtlinien zum Primer- und MGB-Sonden-Design**

| <b>Sondenrichtlinien</b>  | <b>Primerrichtlinien</b>   |
|---|--|
| Wählen Sie zuerst die Sonde, und orientieren Sie dann das Design der Primer so stark wie möglich am Sonden-Design, ohne dabei mit der Sonde zu überlappen (besonders zu empfehlen sind Amplikons mit 50 bis 150 Basispaaren). |  |
| Der G/C-Gehalt sollte im Bereich von 30 bis 80 % liegen.  |  |
| Die Aufeinanderfolge von gleichen Nukleotiden, insbesondere von mehr als 4 Guanin, sollte vermieden werden.   |  |
| Bei der Verwendung der Primer Express®-Software sollte die Schmelztemperatur zwischen 68 und 70 °C liegen.  | Bei der Verwendung der Primer Express®-Software sollte die Schmelztemperatur zwischen 58 und 60 °C liegen. |
| Das 5'-Ende sollte kein G aufweisen.  | Die letzten fünf Nukleotide am 3'-Ende sollten nicht mehr als zwei G- bzw. C-Basen aufweisen.              |
| Die TaqMan® MGB-Sonden sollten so kurz wie möglich sein, jedoch mindestens 13 Nukleotide aufweisen.   |  |

## Auswahl der Reagenzien

Für Quantifizierungsanalysen stehen mehrere TaqMan- und SYBR Green-Reagenzien zur Verfügung. Die Wahl der Reagenzien hängt von der Zielsequenz ab:

- DNA oder cDNA (unten)
- RNA mit 1-Schritt-RT-PCR (Seite 3-27)
- RNA mit 2-Schritt-RT-PCR (Seite 3-27)

**Hinweis:** Wenn Sie SYBR Green-Reagenzien verwenden, empfiehlt Applied Biosystems nachdrücklich die *Power SYBR Green*-Reagenzien.

### DNA- oder cDNA-Quantifizierung

| Reagenzien             | Kit  | Bestell-Nr. |
|------------------------|--|-------------|
| TaqMan®-Reagenzien     | TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG, 250 Reaktionen | 4352042     |
|                        | TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, 200 Reaktionen                          | 4304437     |
|                        | TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, 2000 Reaktionen                         | 4326708     |
|                        | 10er-Packung, TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix                            | 4305719     |
|                        | TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 200 Reaktionen        | 4324018     |
|                        | TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 2000 Reaktionen       | 4326614     |
|                        | 10er-Packung, TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG          | 4324020     |
|                        | TaqMan® PCR Core Reagents Kit, 200 Reaktionen                                | N808-0228   |
| SYBR® Green-Reagenzien | <i>Power SYBR® Green</i> PCR Master Mix (1 ml), 40 Reaktionen                | 4368577     |
|                        | <i>Power SYBR® Green</i> PCR Master Mix (5-ml), 200 Reaktionen               | 4367659     |
|                        | <i>Power SYBR® Green</i> PCR Master Mix (10 × 5-ml), 2000 Reaktionen         | 4368708     |
|                        | <i>Power SYBR® Green</i> PCR Master Mix (50 ml), 2000 Reaktionen             | 4367660     |
|                        | SYBR® Green PCR Master Mix (1-ml), 40 Reaktionen                             | 4344463     |
|                        | SYBR® Green PCR Master Mix (5-ml), 200 Reaktionen                            | 4309155     |
|                        | SYBR® Green PCR Master Mix (50-ml), 2000 Reaktionen                          | 4334973     |
|                        | SYBR® Green PCR Core Reagents, 200 Reaktionen                                | 4304886     |

**RNA-  
Quantifizierung  
mit 1-Schritt-  
RT-PCR**

| Reagenzien                 | Kit  | Bestell-Nr. |
|----------------------------|--|-------------|
| TaqMan®-<br>Reagenzien     | TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit  | 4309169     |
|                            | TaqMan® EZ RT-PCR Core Reagents<br><b>Hinweis:</b> Die TaqMan® EZ RT-PCR Core Reagents sind für RT-Schritte mit hohen Temperaturen zu verwenden. | N808-0236   |
| SYBR® Green-<br>Reagenzien | Power SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit  | 4368711     |
|                            | SYBR® Green RT-PCR Reagents  | 4310179     |

**RNA-  
Quantifizierung  
mit 2-Schritt-  
RT-PCR**

| Reagenzien                    | Schritt                          | Kit  | Bestell-Nr. |
|-------------------------------|----------------------------------|--|-------------|
| TaqMan®-<br>Reagenzien        | Nur PCR-<br>Schritt              | TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix                          | 4304437     |
|                               |                                  | TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG | 4352042     |
|                               | Nur RT-Schritt                   | High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits                | 4374966     |
|                               |                                  | TaqMan® Reverse Transcription Reagents                       | N808-234    |
|                               | Sowohl RT- als auch PCR-Schritte | TaqMan® Gold RT PCR kit                                      | N808-232    |
| SYBR®<br>Green-<br>Reagenzien | Nur PCR-<br>Schritt              | Power SYBR® Green PCR Master Mix                             | 4367659     |
|                               |                                  | SYBR® Green PCR Master Mix                                   | 4309155     |
|                               | Nur RT-Schritt                   | High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits                | 4374966     |
|                               |                                  | TaqMan® Reverse Transcription Reagents                       | N808-234    |
|                               | Sowohl RT- als auch PCR-Schritte | Power SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit                        | 4368711     |
|                               |                                  | SYBR® Green RT-PCR Reagents                                  | 4310179     |

**Informationen zur  
AmpliQ Gold  
DNA Polymerase**

Die Verwendung des „Hot-Start“-Enzyms AmpliQ Gold® DNA Polymerase ist ein integraler Bestandteil der Applied Biosystems-Richtlinien zum Assay-Design, sowohl für TaqMan- als auch für SYBR Green-Reagenzien. AmpliQ Gold DNA Polymerase sorgt für eine stabile Reaktion und kann die Bildung unspezifischer Produkte erheblich senken. Ein weiterer Pluspunkt ist das vereinfachte Assay-Setup, das bei Zimmertemperatur vorgenommen werden kann.

**Hinweis:** Die im TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X) enthaltene DNA-Polymerase, No AmpErase UNG, ist zu einer sehr schnellen „Hot-Start“-PCR fähig. Die Leistung entspricht der Leistung der AmpliQ Gold DNA Polymerase.

**Informationen zur MultiScribe Reverse Transcriptase**

MultiScribe™ Reverse Transcriptase ist eine rekombinante Moloney Murine Leukemia Virus (MuLV) Reverse Transcriptase, die RNA in komplementäre DNA (cDNA) revers transkribiert.

**Empfohlene Thermocycling-Bedingungen**

Verwenden Sie die für Ihre Probe empfohlenen Thermocycling-Bedingungen:

- DNA oder cDNA (unten)
- RNA mit 1-Schritt-RT-PCR (Seite 3-29)
- RNA mit 2-Schritt-RT-PCR (Seite 3-29)

**Hinweis:** Die Thermocycling-Bedingungen für Fast-Reagenzien unterscheiden sich von den Thermocycling-Bedingungen für Standardreagenzien.

**DNA- oder cDNA-Quantifizierung**

Für den TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase UNG, gelten die folgenden Bedingungen:

| Zeiten und Temperaturen    |                 |                 |                      |
|----------------------------|-----------------|-----------------|----------------------|
| Vor der PCR                |                 | PCR (40 Zyklen) |                      |
| AmpErase® UNG-Aktivierung‡ | Aktivierung     | Denaturieren    | Anlagerung/Extension |
| HALTEN                     | HALTEN          | ZYKLUS          |                      |
| 2 Min. @ 50 °C             | 20 Sek. @ 95 °C | 3 Sek. @ 95 °C  | 30 Sek. @ 60 °C      |

‡ Ist nur bei Zugabe von AmpErase® UNG zu den Reaktionen erforderlich.

Für den TaqMan 2X Universal PCR Master Mix und den Power SYBR Green PCR Master Mix gelten die folgenden Bedingungen:

| Zeiten und Temperaturen    |  |                 |                      |
|----------------------------|--|-----------------|----------------------|
| Vor der PCR                |  | PCR (40 Zyklen) |                      |
| AmpErase® UNG-Aktivierung‡ | AmpliAq Gold® DNA Polymerase-Aktivierung | Denaturieren    | Anlagerung/Extension |
| HALTEN                     | HALTEN                                   | ZYKLUS          |                      |
| 2 Min. @ 50 °C             | 10 Min. @ 95 °C                          | 15 Sek. @ 95 °C | 1 Min. @ 60 °C       |

‡ Ist nur erforderlich, wenn AmpErase® UNG zu den Reaktionen hinzugegeben wird oder im Master-Mix enthalten ist.

**RNA-  
Quantifizierung  
mit 1-Schritt-  
RT-PCR**

Für den TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit oder den *Power SYBR Green RT-PCR Reagents Kit* gelten die folgenden Bedingungen:

| Zeiten und Temperaturen |   |                 |                      |
|-------------------------|---|-----------------|----------------------|
| Vor der PCR             |   | PCR (40 Zyklen) |                      |
| Reverse Transkription   | AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase-Aktivierung | Denaturieren    | Anlagerung/Extension |
| HALTEN                  | HALTEN                                    | 40 ZYKLEN       |                      |
| 30 Min. @ 48 °C         | 10 Min. @ 95 °C                           | 15 Sek. @ 95 °C | 1 Min. @ 60 °C       |

**Hinweis:** Diese Bedingungen gelten nicht für den TaqMan EZ RT-PCR Kit. Siehe *TaqMan® EZ RT-PCR Kit Protocol* für die entsprechenden Bedingungen.

**RNA-  
Quantifizierung  
mit 2-Schritt-  
RT-PCR**

Für den High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit gelten die folgenden Bedingungen:

| Schritt  | Zeiten und Temperaturen |                  |
|--|-------------------------|------------------|
| 1. RT-Schritt  | Schritt 1               | Schritt 2        |
|  | HALTEN                  | HALTEN           |
|  | 10 Min. @ 25 °C         | 120 Min. @ 37 °C |
| Nach der reversen Transkription der RNA in cDNA (RT-Schritt) können Proben gelagert oder für den unten beschriebenen nachfolgenden PCR-Schritt verwendet werden. |                         |                  |

**WICHTIG!** Für die meisten Applikationen und wenn große Mengen an cDNA benötigt werden, empfiehlt Applied Biosystems für die reverse Transkription 120 Minuten bei 37 °C, um eine optimale Umwandlung zu erzielen.

Für den TaqMan 2× Universal PCR Master Mix (mit AmpErase UNG) oder den Power SYBR Green PCR Master Mix gelten die folgenden Bedingungen:

| Schritt        | Zeiten und Temperaturen          |   |                 |                          |
|----------------|----------------------------------|---|-----------------|--------------------------|
| 2. PCR-Schritt | Vor der PCR                      |   | PCR (40 Zyklen) |                          |
|                | AmpErase®<br>UNG-<br>Aktivierung | AmpliTaQ Gold®<br>DNA<br>Polymerase-<br>Aktivierung | Denaturieren    | Anlagerung/<br>Extension |
|                | HALTEN                           | HALTEN  | ZYKLUS          |                          |
|                | 2 Min. @ 50 °C                   | 10 Min. @ 95 °C                                     | 15 Sek. @ 95 °C | 1 Min. @ 60 °C           |

Für den TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2×), No AmpErase UNG, gelten die folgenden Bedingungen:

| Schritt        | Zeiten und Temperaturen           |   |                 |                          |
|----------------|-----------------------------------|---|-----------------|--------------------------|
| 2. PCR-Schritt | Vor der PCR                       |   | PCR (40 Zyklen) |                          |
|                | AmpErase®<br>UNG-<br>Aktivierung‡ | AmpliTaQ Gold®<br>DNA<br>Polymerase-<br>Aktivierung | Denaturieren    | Anlagerung/<br>Extension |
|                | HALTEN                            | HALTEN  | ZYKLUS          |                          |
|                | 2 Min. @ 50 °C                    | 20 Sek. @ 95 °C                                     | 3 Sek. @ 95 °C  | 30 Sek. @ 60 °C          |

‡ Ist nur bei Zugabe von AmpErase® UNG zu den Reaktionen erforderlich.

## Optimieren der Primerkonzentrationen

Indem die Konzentrationen von Forward und Reverse Primer unabhängig voneinander variiert werden, können Sie die Konzentrationen für eine optimale Assay-Leistung identifizieren. Primer sind während der exponentiellen Phase der PCR-Amplifikation immer in großem molarem Überschuss vorhanden.

Wenn Sie TaqMan 2× Universal PCR Master Mix verwenden, empfiehlt Applied Biosystems die unten im Abschnitt „Standard-konzentrationen für Primer“ angegebenen Primerkonzentrationen. Im weiteren Verlauf finden Sie ausführliche Beschreibungen zu den folgenden Themen:

- Matrix zur Primeroptimierung (unten)
- TaqMan-Reagenzien (unten)
- SYBR Green-Reagenzien (Seite 3-33)

### Standard-konzentrationen für Primer

Die in der unten stehenden Tabelle empfohlenen initialen Primerkonzentrationen gelten für DNA- und cDNA-Quantifizierungs-Assays.

| Reagenzien                         | Konzentrationen (nM) |                |
|------------------------------------|----------------------|----------------|
|                                    | Forward Primer       | Reverse Primer |
| TaqMan <sup>®</sup> -Reagenzien    | 900                  | 900            |
| SYBR <sup>®</sup> Green-Reagenzien | 50                   | 50             |

### Matrix zur Primer-optimierung

Anhand einer Matrix zur Primeroptimierung können Sie ermitteln, ob sich bei minimaler Primerkonzentration ein minimaler  $C_T$ -Wert und ein maximaler  $\Delta R_n$ -Wert ergibt.

Eine Matrix zur Primeroptimierung kann helfen, unspezifischen Primer-Bindungen entgegenzuwirken, wodurch die für die Bindung an der spezifischen Position verfügbare Primermenge reduziert werden würde.

### TaqMan-Reagenzien

Bei Quantifizierungs-Assays, die TaqMan-Reagenzien verwenden, können Sie eine optimale Leistung erzielen, wenn Sie die Primerkonzentrationen mit dem niedrigsten  $C_T$ -Wert und dem höchsten  $\Delta R_n$ -Wert für eine fest definierte Menge an Ziel-Template wählen.

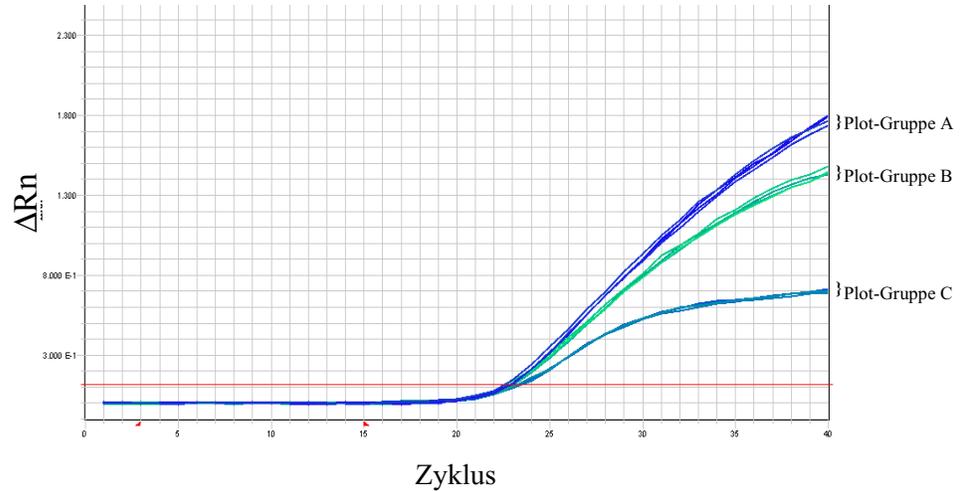
**Hinweis:** Obwohl die  $C_T$ -Werte die Parameter sind, mit denen quantitative Werte in Echtzeit-Quantifizierungs-Assays zugewiesen werden, können auch  $\Delta R_n$ -Werte wichtig sein, wenn Sie eine maximale Sensitivität und Reproduzierbarkeit erhalten möchten.

Die Ergebnisse einer typischen Analyse der Matrix zur Primeroptimierung mit TaqMan-Reagenzien werden in Abbildung 3-3 auf Seite 3-32 dargestellt:

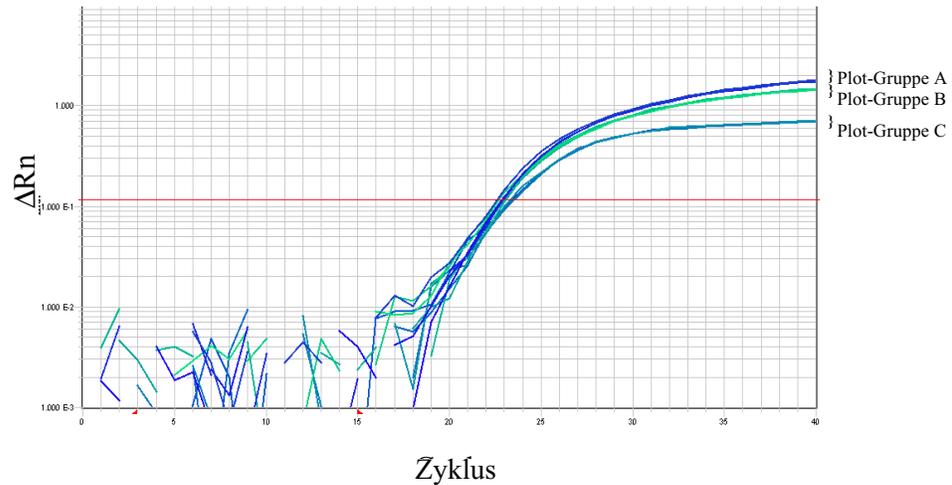
- Abbildung 3-3a zeigt eine lineare Ansicht der Amplifikationsdarstellungen für alle Kombinationen an Primerkonzentrationen.
- Abbildung 3-3b zeigt die gleichen Daten als Log-Ansicht.

Die Kombination von 50 nM an Forward und Reverse Primer (Plot-Gruppe C) weisen sowohl den niedrigsten  $\Delta R_n$ - als auch den höchsten  $C_T$ -Wert auf. Alle anderen Primerkombinationen mit einer 150-nM-Konzentration entweder des Forward oder des Reverse Primers (Plot-Gruppe B) weisen einen verringerten  $\Delta R_n$ -Wert auf. Alle Primerkombinationen mit mindestens 300 nM des Forward bzw. des Reverse Primers (Plot-Gruppe A) weisen sowohl den höchsten  $\Delta R_n$ -Wert als auch den niedrigsten  $C_T$  Wert auf; folglich bieten alle Primerkonzentrationen der Darstellungsgruppen A und B eine optimale Leistung.

**a) Lineare Ansicht**



**b) Log-Ansicht**



**Abbildung 3-3 Versuchsergebnisse der Primeroptimierung mit den Primerkonzentrations-abhängigen Amplifikationskurven (lineare und Log-Ansicht)**

Schlüssel zu den Plot-Gruppen:

- A: Kombinationen mit mindestens 300 nM an Forward und Reverse Primer
- B: Kombinationen mit mindestens 150 nM an Forward und Reverse Primer
- C: Kombinationen mit mindestens 50 nM an Forward und Reverse Primer

**SYBR Green-Reagenzien**

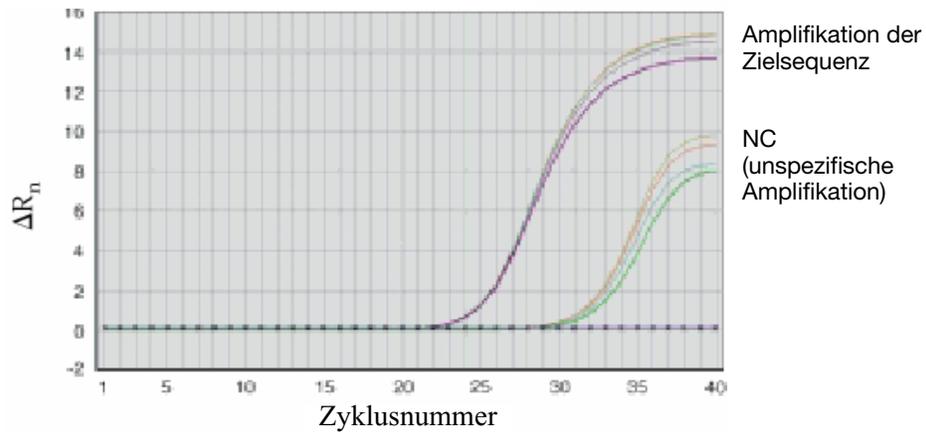
Die Optimierung von Primerkonzentrationen ist etwas komplexer für Quantifizierungs-Assays, die SYBR Green-Reagenzien verwenden. Sie sollten die gleiche Matrix zur Primeroptimierung wie für die TaqMan-Reagenzien ausführen, allerdings unter Einbeziehung von Negativkontrollen für SYBR Green-Reagenzien. Die gewählten Primerkonzentrationen sollten bei Durchführung eines Laufs, der die Zielsequenz enthält, einen niedrigen  $C_T$ -Wert und einen hohen  $\Delta R_n$ -Wert aufweisen, bei Negativkontrollen aber keine unspezifische Produktformation erzeugen.

Schmelzkurven- oder Gelanalysen sind sehr nützlich, wenn die optimalen Primerkonzentrationen für Quantifizierungsanalysen mit SYBR Green-Reagenzien ausgewählt werden sollen. Abbildung 3-4 auf Seite 3-34 zeigt die Ergebnisse einer Matrix zur Primeroptimierung bei Primerkonzentrationen von 900 nM an Forward und Reverse Primer:

- Abbildung 3-4a zeigt eine starke Amplifikation der Negativkontroll-Wells; dies weist auf eine signifikante unspezifische Amplifikation hin.
- Abbildung 3-4b zeigt, dass die ohne Template entstandene Schmelztemperatur des Produkts niedriger als die Schmelztemperatur des mit Template erstellten spezifischen Produkts ist; dies weist auf eine signifikante unspezifische Amplifikation hin.

Die in Abbildung 3-4 dargestellten Ergebnisse sind typisch für die Bildung von Primer-Dimer. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass niedrige Primerkonzentrationen bessere Ergebnisse liefern können. Zusätzlich können Sie einen neuen Primerset für die jeweilige Zielsequenz entwerfen.

**a) Amplifikationsdarstellung, lineare Ansicht**



**b) Schmelzkurvenanalyse**

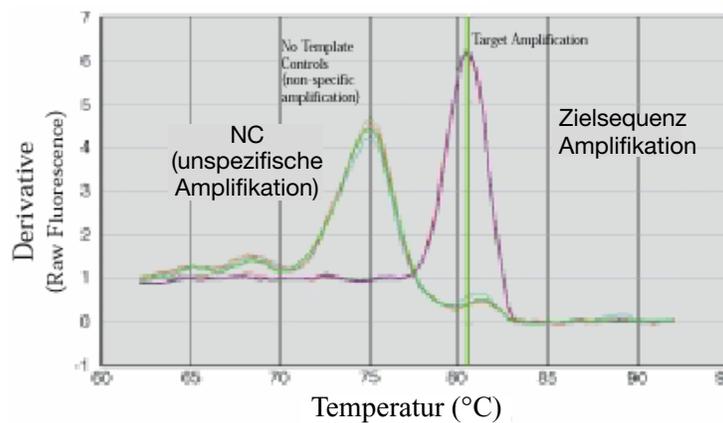


Abbildung 3-4 Amplifikationsdaten bei Verwendung von SYBR® Green-Reagenzien

- (a) Die Amplifikationsdarstellung (lineare Ansicht) weist eine vermutlich unspezifische Amplifikation in den Negativkontroll-(NC)-Wells auf.
- (b) Die Schmelzkurvenanalyse bestätigt, dass sich die Schmelztemperatur des Produkts in den NC-Wells von der Schmelztemperatur des spezifischen Produkts unterscheidet.

## Optimieren der Sondenkonzentration

Bei der Detektion durch TaqMan®-Sonden garantiert die empfohlene Sondenkonzentration von 250 nM eine exzellente Assay-Leistung. Dennoch kann in Abhängigkeit von den Anforderungen des Assays ein Experiment zur Sondenoptimierung nützlich sein.

**Hinweis:** Bei Detektion mit SYBR Green I-Farbstoff wird keine Sonde benötigt.

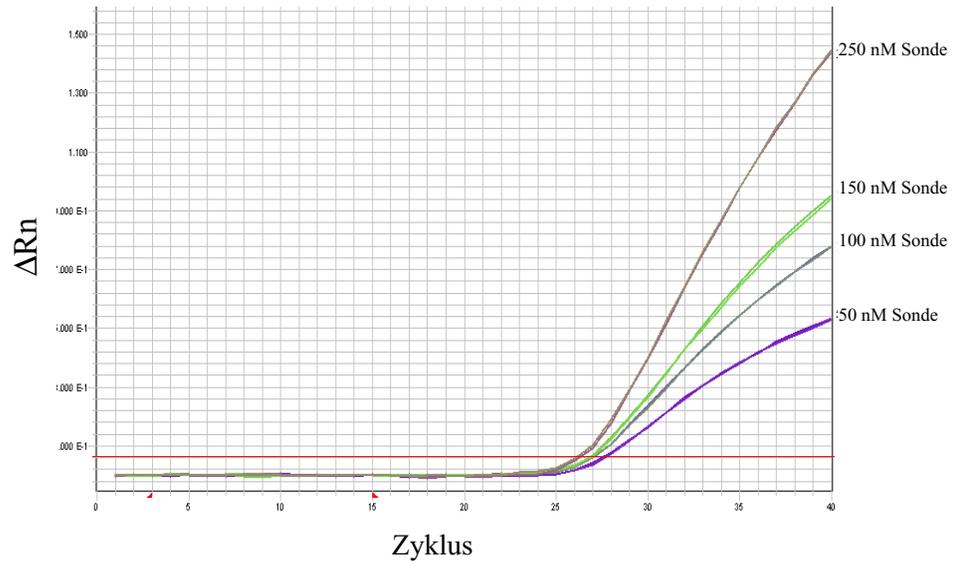
**Empfohlene  
Sonden-  
konzentrationen**

Die empfohlenen Sondenkonzentrationen für DNA- und cDNA-Quantifizierungs-Assays, die TaqMan-Reagenzien verwenden, beträgt 250 nM. Abbildung 3-5 zeigen die Ergebnisse einer Analyse zur Sondenoptimierung, in denen die Sondenkonzentration zwischen 50 und 250 nM schwanken:

- Abbildung 3-5a zeigt einen Anstieg des  $\Delta R_n$ -Werts bei Erhöhung der Sondenkonzentration.
- Abbildung 3-5b zeigt veränderte  $C_T$ -Werte bei ausreichenden Sondenkonzentrationen.

Um vor allem bei der Detektion von wenigen Kopien einer Zielsequenz die beste Reproduzierbarkeit sicherzustellen, sollten Sie Sonden-limitierende Konzentrationen vermeiden. Führen Sie den Assay bei einer Sondenkonzentration von 250 nM aus. Indem Sie eine Konzentration von 250 nM verwenden, vermeiden Sie Sonden-Limitierung und erzielen hohe  $\Delta R_n$ -Werte. Hohe  $\Delta R_n$ -Werte weisen auf einen stabilen und mit hoher Effizienz durchgeführten Assay hin, der eine hohe Produktausbeute vorweisen kann und eine genaue Messung von Spitzenwerten ermöglicht.

a) Lineare Ansicht



b) Log-Ansicht

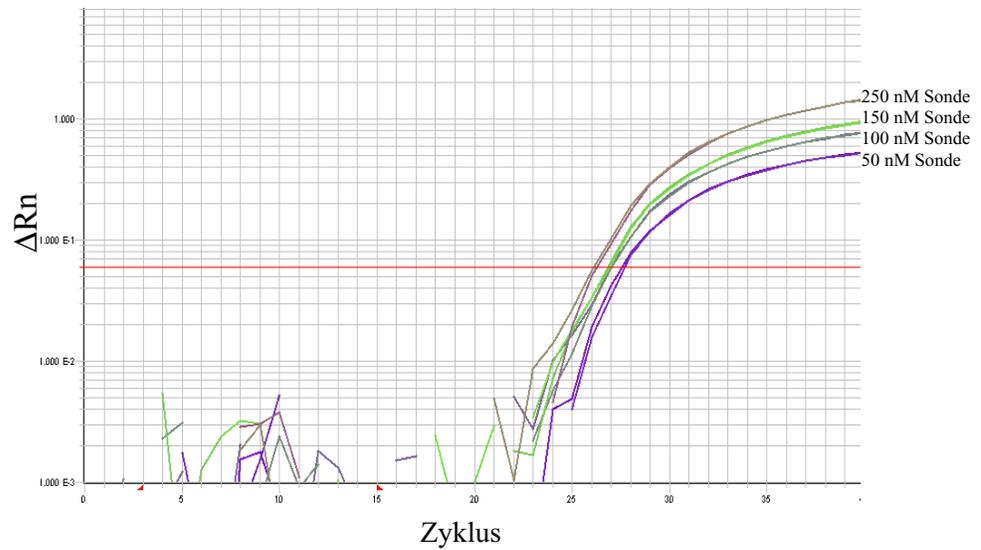


Abbildung 3-5 Amplifikationsdarstellung (lineare und Log-Ansichten) der Titrierung von Sondenkonzentrationen von 50 bis 250 nM

## Weitere Informationen

Weitere Informationen:

- Informationen zur Verwendung von TaqMan-Reagenzien finden Sie in den folgenden Protokollen:
  - *TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mix (2X) Protocol*
  - *TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix Protocol*
- Informationen zur Verwendung von SYBR Green-Reagenzien finden Sie in den folgenden Protokollen:
  - *Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix and RT-PCR Protocol*
  - *SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix and RT-PCR Reagents Protocol*
  - *SYBR<sup>®</sup> Green PCR and RT-PCR Reagents Protocol*
- Informationen zur Durchführung von Quantifizierungsanalysen auf dem StepOne-System finden Sie in den folgenden Handbüchern:
  - *Applied Biosystems StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR System Einführungshandbuch zu Standardkurven-Analysen*
  - *Applied Biosystems StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR System Einführungshandbuch zu relativen Standardkurven- und vergleichenden C<sub>T</sub>-Analysen*
- Informationen über Positiv-/Negativanalysen finden Sie im *Applied Biosystems StepOne<sup>™</sup> Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments*.



Dieses Kapitel umfasst die folgenden Themen:

Abschnitt 4.1 Informationen zu Genotypisierungsanalysen . . . 4-3

Abschnitt 4.2 Design-Richtlinien . . . . . 4-9



## Abschnitt 4.1 Informationen zu Genotypisierungsanalysen

---

Dieser Abschnitt umfasst die folgenden Themen:

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| Überblick .....              | 4-4 |
| Auswahl des Assay-Typs ..... | 4-6 |

## Überblick

### Was ist eine Genotypisierungsanalyse?

Eine Genotypisierungsanalyse ist eine Endpunktanalyse zur Bestimmung des Genotyps unbekannter Proben. Bei diesem Analysetypus kann ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) differenziert werden.

Bei einer Genotypisierungsanalyse wird bestimmt, ob unbekannte Proben zu einem der folgenden Genotypen gehören:

- homozygot (Proben mit nur Allel 1)
- homozygot (Proben mit nur Allel 2)
- heterozygot (Proben mit sowohl Allel 1 als auch 2)

### Komponenten

PCR-Reaktionen für Genotypisierungsanalysen enthalten die folgenden Komponenten:

- **Probe:** Probenmaterial mit einem unbekanntem Genotyp der Zielsequenz
- **(Optional) Replikate:** identische Reaktionen mit identischen Komponenten und Volumina
- **Negativkontrollen:** Proben, die statt Template Wasser oder Puffer enthalten und auch als No Template Control (NTC) bezeichnet werden. Negativkontrollen sollten nicht amplifiziert werden.
- **(Optional) Positivkontrollen:** Proben, die bekannte Genotypen aufweisen (homozygot für Allel 1, homozygot für Allel 2 und heterozygot für Allele 1 und 2)

### Geräte

Genotypisierungsanalysen bestehen aus zwei Schritten: Thermocycling (PCR-Amplifikation), gefolgt von einem Endpunktnachweis der resultierenden Fluoreszenzsignale. Das Thermocycling (PCR-Amplifikation) kann mithilfe des StepOne™ Real-Time PCR Systems von Applied Biosystems oder mit einem konventionellen Thermocycler durchgeführt werden.

Beachten Sie bei Verwendung des StepOne™-Systems Folgendes:

- Es besteht die Möglichkeit der Analyse der PCR. Dies ist hilfreich für die Fehlerbehebung.
- Führen Sie die Endpunktmessung der Platte separat durch.

### Funktionsweise von Genotypisierungsanalysen

Für Genotypisierungsanalysen enthält die PCR für jedes Allel eine spezielle Sonde, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist. Die Sonden enthalten verschiedene fluoreszierende Reporter-Farbstoffe, um die einzelnen Allele differenzieren zu können.

Für das StepOne-System können TaqMan® Minor Groove Binder (MGB)-Sonden verwendet werden. Jede TaqMan® MGB-Sonde enthält die folgenden Komponenten:

- einen Reporter am 5'-Ende jeder Sonde
  - Der Farbstoff VIC® befindet sich am 5'-Ende der Sonde für Allel 1.
  - Der Farbstoff FAM™ befindet sich am 5'-Ende der Sonde für Allel 2.

- einen Minor Groove Binder (MGB)  
Durch diese Modifikation wird die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Sonden erhöht, ohne die Sonden zu verlängern (Afonina *et al.*, 1997; Kutyavin *et al.*, 1997). Dies ermöglicht das Design kürzerer Sonden. Folglich zeigen TaqMan-MGB-Sonden größere Unterschiede zwischen den  $T_m$ -Werten der perfekt passenden und der nicht passenden Sonde. Größere Unterschiede bei den  $T_m$ -Werten führen daher zu einer exakteren Genotypisierung.
- einen nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) am 3'-Ende der Sonde  
Da der Quencher nicht fluoresziert, kann der Beitrag des Reporter-Farbstoffs durch Real-Time PCR-Systeme exakt gemessen werden.

Während der PCR bindet jede Sonde spezifisch an die entsprechende Komplementärsequenz zwischen Forward- und Reverse-Primer. AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA-Polymerase kann nur Sonden spalten, die an die Allelsequenz hybridisieren (perfekt passen). Bei der Spaltung entfernt sich der Reporter vom Quencher. Die Fluoreszenz des Reporters verstärkt sich. Somit zeigt das während der PCR-Amplifikation entstehende Fluoreszenzsignal die in der Probe enthaltenen Allele an.

#### Fehlerhafte Übereinstimmung zwischen Sonde und Allelsequenzen

Eine fehlerhafte Übereinstimmung zwischen einer Sonde und dem Allel (Abbildung 4-1) verringert die Effizienz der Sondenhybridisierung. Außerdem ist es wahrscheinlicher, dass die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase die nicht passende Sonde abdrängt, statt sie zu spalten, um den Reporter-Farbstoff freizusetzen.

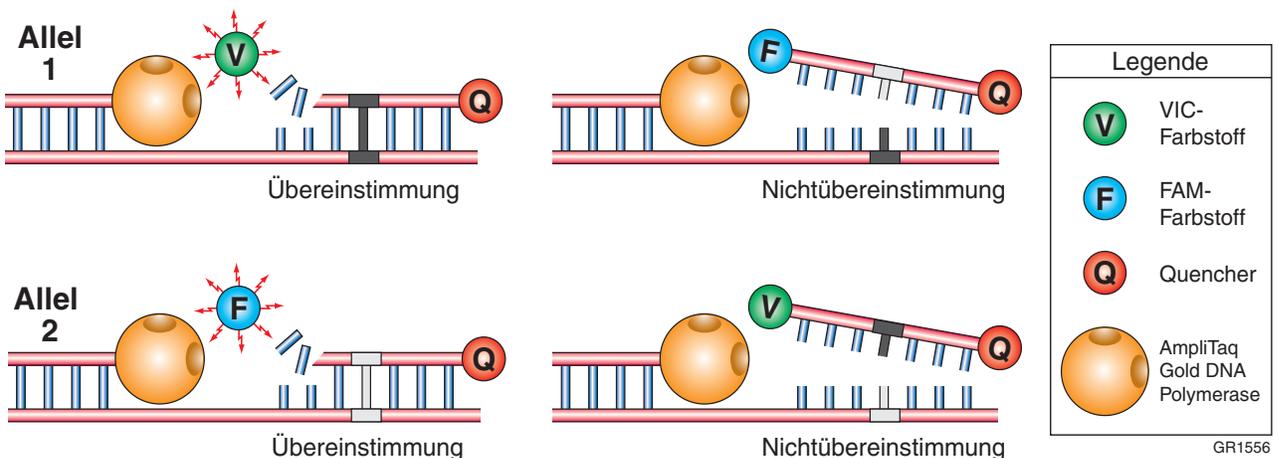


Abbildung 4-1 Perfekte Übereinstimmung und fehlerhafte Übereinstimmung zwischen Allel und Sondensequenz bei Genotypisierungsanalysen

Tabelle 4-1 fasst die möglichen Ergebnisse des oben abgebildeten Beispiels für eine Genotypisierungsanalyse zusammen.

Tabelle 4-1 Ergebnisse der Genotypisierungsanalyse

| Erhebliche Verstärkung...                           | zeigt...                 |
|---|--------------------------|
| nur der Fluoreszenz des Farbstoffs VIC <sup>®</sup> | Homozygotie für Allel 1. |
| nur der Fluoreszenz des Farbstoffs FAM <sup>™</sup> | Homozygotie für Allel 2. |
| beider Fluoreszenzsignale                           | Heterozygotie.           |

- Arbeitsablauf** Bereiten Sie die Genotypisierungsanalysen vor ihrer Durchführung auf dem StepOne-System folgendermaßen vor:
1. Wählen Sie den Assay-Typ aus (siehe unten).
  2. Prüfen Sie die Design-Hinweise für den ausgewählten Assay-Typ (Abschnitt 4.2 auf Seite 4-9).

## Auswahl des Assay-Typs

Bei der Einrichtung Ihres Analysedesigns mit der StepOne-Software können Sie zwischen den folgenden Assay-Typen für Genotypisierungsanalysen wählen:

- Pre-Designed/Validated (Vorentworfen/validiert, siehe unten)
- Custom, (Kundenspezifisch, Seite 4-7)

In diesem Abschnitt werden die für jeden Assay-Typ verfügbaren Produkte aufgelistet.

**Hinweis:** Die Assays sind für die jeweiligen Zielsequenzen spezifisch. Die Master-Mixe enthalten die übrigen für die PCR-Reaktion benötigten Komponenten.

**Hinweis:** TaqMan<sup>®</sup> Fast-Reagenzien und SYBR<sup>®</sup> Green-Reagenzien werden für Genotypisierungsanalysen nicht unterstützt.

**Vorentworfene/  
validierte Assays**

| Produkt   | Eigenschaften  |
|---|--|
| TaqMan® SNP Genotyping Assays                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>vorentworfene Assays für eine genomweite Markerabdeckung mit hoher Dichte</li> <li>für Screening-, Assoziations-, Kandidatenbereichs-, Kandidatengen- oder Feinkartierungsstudien</li> <li>praktisches Ein-Röhrchen-Format</li> </ul>   |
| TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>Detektion von Polymorphismen in 220 Genen verschiedener Enzyme des Arzneistoffmetabolismus sowie Arzneistofftransports</li> <li>für die Untersuchung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP), Insertionen/Deletionen (in/dels) und Mehrfachnukleotid-Polymorphismen (MNP)</li> </ul>   |
| Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Genotypisieren gereinigter DNA-Proben für spezifische Mutationen; die meisten Assays unterscheiden zwischen zwei Allelen mit Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP)</li> <li>zusätzlicher Minor Groove Binder (MGB) für bessere Genotypisierung</li> <li>zusätzliche Kontroll-DNA für Allele 1 und 2, damit bei jedem Durchlauf beide homozygoten Signale generiert werden können</li> <li>Closed-tube system (erfordert keine weitere Manipulation nach der PCR oder die Verwendung eines Gels)</li> </ul> |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase® UNG) | <ul style="list-style-type: none"> <li>bietet eine optimale Leistung bei TaqMan®-Assays, die cDNA oder DNA als Template verwenden</li> <li>enthält Komponenten zur Sicherstellung einer hervorragenden Assay Performance</li> <li>die Verwendung eines Reagenz für alle Assays vereinfacht den Prozess der Assay-Implementierung</li> </ul>  |

Hinweise zur Einrichtung Ihres Analysedesigns mit vorentworfenen/validierten Assays finden Sie auf Seite 4-10.

**Eigene (kunden-  
spezifische)  
Assays**

| Produkt   | Eigenschaften   |
|---|---|
| Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>jeder Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) in jedem Organismus</li> <li>Nachweis von Insertionen/Deletionen (in/dels) von bis zu sechs Basen</li> <li>Nachweis von Mehrfachnukleotid-Polymorphismen (MNP) von bis zu sechs Basen.</li> <li>praktisches Ein-Röhrchen-Format</li> </ul>                |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase® UNG) | <ul style="list-style-type: none"> <li>bietet eine optimale Leistung bei TaqMan®-Assays, die cDNA oder DNA als Template verwenden</li> <li>enthält Komponenten zur Sicherstellung einer hervorragenden Assay Performance</li> <li>die Verwendung eines Reagenz für alle Assays vereinfacht den Prozess der Assay-Implementierung</li> </ul> |

Hinweise zur Einrichtung Ihres Analysedesigns für eigene (kundenspezifische) Assays finden Sie auf Seite 4-14.



---

## Abschnitt 4.2 Design-Richtlinien

---

Dieser Abschnitt umfasst die folgenden Themen:

|   |      |
|---|------|
| Vorentworfene/validierte Assays . . . . .                                 | 4-10 |
| TaqMan® SNP Genotyping Assays . . . . .                                   | 4-10 |
| TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays . . . . .                       | 4-11 |
| Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination . . . . . | 4-12 |
| Auswahl des Master-Mixes . . . . .  | 4-13 |
| Experimentelles Design. . . . .   | 4-13 |
| Eigene (kundenspezifische) Assays . . . . .                               | 4-14 |
| Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays . . . . .                            | 4-14 |
| Auswahl des Master-Mixes . . . . .  | 4-16 |
| Experimentelles Design. . . . .   | 4-16 |

## Vorentworfene/validierte Assays

**Arbeitsablauf** Bei der Entwicklung einer Genotypisierungsanalyse mithilfe der vorentworfenen/validierten Assays von Applied Biosystems empfiehlt Applied Biosystems die Einhaltung des unten aufgeführten Arbeitsablaufs:

1. Wählen Sie den Assay aus:
  - TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays (siehe unten).
  - TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assays (Seite 4-11).
  - TaqMan<sup>®</sup> Pre-Developed Assays Reagents for Allelic Discrimination (Seite 4-12).
2. Wählen Sie den Master-Mix aus (Seite 4-13).
3. Richten Sie das Analysedesign mit der StepOne<sup>™</sup>-Software ein (Seite 4-13).

## TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays

**Produktbeschreibung** TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays sind eine umfassende Kollektion von Primer- und Sondensets für die Genotypisierung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) beim Menschen.

Die Assays verwenden TaqMan<sup>®</sup>-Reagenzien für die Amplifikation und den Nachweis spezifischer SNP-Allele in gereinigten genomischen DNA-Proben. Alle Assays wurden mittels bioinformatischer Anwendungen und Software von Applied Biosystems sowie genomischer Information von Celera Genomics und öffentlich zugänglicher Datenbanken erstellt.

**Produkt-eigenschaften** Für alle TaqMan SNP Genotyping Assays gilt Folgendes:

- Sie benötigen drei Komponenten:
  - 1 bis 20 ng gereinigte genomische DNA-Probe
  - 20X, 40X oder 80X SNP Genotyping Assay Mix (spezifisch für jeden Polymorphismus). Jeder Assay enthält sequenzspezifische Forward- und Reverse-Primer für die Amplifizierung des betreffenden SNP sowie zwei TaqMan MGB-Sonden: eine mit dem Farbstoff VIC<sup>®</sup> markierte Sonde für den Nachweis der Allel-1-Sequenz und eine mit dem Farbstoff FAM<sup>™</sup> markierte Sonde für den Nachweis der Allel-2-Sequenz.
  - TaqMan<sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase<sup>®</sup> UNG)
- designed und optimiert für den TaqMan 2X Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase UNG) und die Universellen Thermocycling-Bedingungen
- sie erfordern eine PCR-Amplifikation und eine Endpunktmessung, um Ergebnisse zu erhalten

**Verfügbare Assays**

TaqMan SNP Genotyping Assays sind in zwei Kategorien verfügbar:

| Kategorie  | Beschreibung   |
|--|--|
| TaqMan® Validated & Coding SNP Genotyping Assays | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ~5000 SNP-Assays im kleinen Synthesemaßstab, ~2000 davon kodierende SNP-Assays</li> <li>• inventarisiert (d. h. ab Lager sofort erhältlich)</li> </ul>  |
| TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assays       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• über 4,5 Millionen vorentworfenene SNP-Assays, einschließlich 3,5 Millionen HapMap- und ~68000 kodierende SNP-Assays</li> <li>• erhältlich im kleinen, mittleren und großen Synthesemaßstab</li> <li>• Made to Order (d. h. werden auf Bestellung hergestellt)</li> </ul> |

**Weitere Informationen**

- Informationen über die neuesten verfügbaren Produkte und jeweiligen Produktverwendungen finden Sie auf der Website von Applied Biosystems: <http://www.appliedbiosystems.com/>
  - a. Wählen Sie unter den TaqMan®-Produkten **TaqMan® SNP Genotyping Assays** aus.
  - b. Wählen Sie auf der Seite mit den SNP-Genotypisierungs-Assays unter Pre-Designed/Validated Assays **TaqMan® SNP Genotyping Assays** aus.
- Weitere Informationen über die Vorbereitung der PCR-Reaktionen mit den TaqMan SNP-Genotypisierungs-Assays finden Sie im *TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol*.

**TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays****Produktbeschreibung**

TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays sind eine umfassende Kollektion von inventarisierten Primer- und SONDENSSETS zur Genotypisierung von SNP, Insertionen und Deletionen (in/dels) sowie Mehrfachnukleotid-Polymorphismen (MNP) in den Genen des Arzneimittelmetabolismus.

Die Assays verwenden TaqMan-Reagenzien für die Amplifikation und den Nachweis spezifischer Polymorphismen in gereinigten genomischen DNA-Proben. Alle Assays wurden mittels bioinformatischer Anwendungen und Software von Applied Biosystems sowie genomischer Information aus öffentlich zugänglichen SNP- und Genomdatenbanken erstellt.

**Produkt-eigenschaften**

Für alle TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays gilt Folgendes:

- Sie benötigen drei Komponenten:
  - 3 bis 30 ng gereinigte genomische DNA-Probe
  - 20X Drug Metabolism Genotyping Assay Mix (spezifisch für jeden Polymorphismus) Jedes Assay enthält sequenzspezifische Forward- und Reverse-Primer für die Amplifizierung der betreffenden polymorphen Sequenz sowie zwei TaqMan MGB-Sonden: eine mit dem Farbstoff VIC markierte Sonde für den Nachweis der Allel-1-Sequenz und eine mit dem Farbstoff FAM markierte Sonde für den Nachweis der Allel-2-Sequenz.
  - TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase® UNG)

**Weitere Informationen**

- designed und optimiert für den TaqMan 2× Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase UNG) und die Universellen Thermocycling-Bedingungen
- sie erfordern eine PCR-Amplifikation und eine Endpunktmessung, um Ergebnisse zu erhalten
- Informationen über die neuesten verfügbaren Produkte und jeweiligen Produktverwendungen finden Sie auf der Website von Applied Biosystems:  
**<http://www.appliedbiosystems.com/>**
  - a. Wählen Sie unter den TaqMan<sup>®</sup>-Produkten **TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays** aus.
  - b. Wählen Sie auf der Seite mit den SNP-Genotypisierungs-Assays unter den vorentworfenen/validierten Assays **TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assays** aus.
- Weitere Informationen über die Vorbereitung der PCR-Reaktionen mit den TaqMan-SNP-Genotypisierungs-Assays finden Sie im *TaqMan<sup>®</sup>-Protokoll für Drug Metabolism Genotyping Assays*.

## Pre-Developed TaqMan<sup>®</sup> Assay Reagents for Allelic Discrimination

**Produktbeschreibung**

Vorentworfene TaqMan<sup>®</sup> Assay-Reagenzien für die Alleldiskriminierung (TaqMan<sup>®</sup> PDARs for AD) sind inventarisierte Assays, die für die Diskriminierung spezifischer Allele optimiert wurden.

**Produkt-eigenschaften**

TaqMan PDARs for AD erfordern drei Komponenten:

- 2 bis 20 ng gereinigte genomische DNA-Probe
- 10× Allelic Discrimination Assay Mix (für jede Zielsequenz spezifisch). Jedes Assay enthält sequenzspezifische Forward- und Reverse-Primer für die Amplifizierung der betreffenden polymorphen Sequenz sowie zwei TaqMan MGB-Sonden: eine mit dem Farbstoff VIC markierte Sonde für den Nachweis der Allel-1-Sequenz und eine mit dem Farbstoff FAM markierte Sonde für den Nachweis der Allel-2-Sequenz.
- TaqMan<sup>®</sup> 2× Universal PCR Master Mix (mit AmpErase<sup>®</sup> UNG)

**Hinweis:** Alle Assays enthalten zusätzliche Kontroll-DNA für die Allele 1 und 2, damit in jedem Lauf die beiden homozygoten Signale generiert werden können.

**Weitere Informationen**

- Informationen über die neuesten verfügbaren Produkte und jeweiligen Produktverwendungen finden Sie auf der Website von Applied Biosystems:  
**<http://www.appliedbiosystems.com/>**
  - a. Wählen Sie unter den TaqMan<sup>®</sup>-Produkten **TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays** aus.
  - b. Wählen Sie auf der Seite mit den SNP-Genotypisierungs-Assays unter den vorentworfenen/validierten Assays **TaqMan<sup>®</sup> Pre-Developed Assay Reagents for Allelic Discrimination (TaqMan<sup>®</sup> PDARs for AD)** aus.
- Weitere Informationen über die Vorbereitung der PCR-Reaktionen mit den TaqMan PDARs for Allelic Discrimination finden Sie im *Protokoll für vorentworfene TaqMan<sup>®</sup> Assay-Reagenzien für die Alleldiskriminierung*.

## Auswahl des Master-Mixes

### Verfügbare Master-Mixe

Die vorentworfenen/validierten Assays für Genotypisierungsanalysen von Applied Biosystems wurden für die folgenden TaqMan® Master-Mixe entwickelt:

- TaqMan PDARs for AD enthalten TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (mit AmpErase® UNG).
- TaqMan SNP Genotyping Assays und Custom TaqMan SNP Genotyping Assays können mit folgenden Master-Mixen verwendet werden:

| Master-Mix   | Bestell-Nr. |
|--|-------------|
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, 200 Reaktionen                    | 4304437     |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, 2000 Reaktionen                   | 4326708     |
| 10er-Packung, TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix                      | 4305719     |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 200 Reaktionen  | 4324018     |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 2000 Reaktionen | 4326614     |
| 10er-Packung, TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG    | 4324020     |

**Hinweis:** Genotypisierungsanalysen werden bei Verwendung von TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix nicht unterstützt.

### Weitere Informationen

Weitere Information zur Verwendung der TaqMan Master-Mixe finden Sie im *TaqMan® Universal PCR Master Mix-Protokoll*.

## Experimentelles Design

### StepOne-Software verwenden

Verwenden Sie für die Einrichtung des Designs der Genotypisierungsanalyse mit den vorentworfenen/validierten Assays von Applied Biosystems die StepOne-Software. Die StepOne-Software berechnet automatisch die Mengen für die:

- Reaktionsmix-Komponenten
- Probenverdünnungen

**Hinweis:** Um einen SNP-Assay in der StepOne-Software auszuwählen, öffnen Sie den Bildschirm SNP-Assays im Arbeitsablauf des Analysedesign-Assistenten oder den Bildschirm Plate Setup (Platteneinrichtung) im Setup für Fortgeschrittene. Im Bildschirm SNP Assays oder Plate Setup (Platteneinrichtung) können Sie aus der Bibliothek einen Assay auswählen oder einen neuen Assay erstellen.

### Weitere Informationen

Weitere Informationen über das Design und die Durchführung von Genotypisierungsanalysen mit dem StepOne-System finden Sie im *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Einführungshandbuch zu Genotypisierungsanalysen*.

## Eigene (kundenspezifische) Assays

**Arbeitsablauf** Bei der Entwicklung einer Genotypisierungsanalyse mithilfe der kundenspezifischen Assays von Applied Biosystems empfiehlt Applied Biosystems die Einhaltung des unten aufgeführten Arbeitsablaufs:

1. Bestellen Sie den Assay: Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays (siehe unten).
2. Wählen Sie den Master-Mix aus (Seite 4-16).
3. Richten Sie das Analysedesign mit der StepOne-Software ein (Seite 4-16).

### Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays

**Produktbeschreibung** Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays sind TaqMan-Sonden- und Primersets, die vom Custom TaqMan® Genomic Assays -Service aufgrund der vom Kunden bereitgestellten Sequenzinformationen entworfen, synthetisiert und formuliert werden. Custom TaqMan SNP Genotyping Assays ermöglichen folgende Untersuchungen:

| Assay   | Beispiel  |
|---|---|
| Genotypisierungsanalysen zu jedem möglichen Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) in jedem Organismus        | AGTTCATCCATGGTCA --><br>AGTTCATACATGGTCA<br>Annotiert als: AGTTCAT[C/A]CATGGTCA |
| Für Genotypisierungsanalysen zum Nachweis von Insertionen/Deletionen (in/dels) von bis zu sechs Basen       | AGTTCATCCATGGTCA --><br>AGTTCATGGTCA<br>Annotiert als: AGTTCAT[CCAT/*]GGTCA     |
| Für Genotypisierungsanalysen zum Nachweis von Mehrfachnukleotid-Polymorphismen (MNP) von bis zu sechs Basen | AGTTCATCCGGTCA --><br>AGTTCATATGGTCA<br>Annotiert als: AGTTCAT[CC/AT]GGTCA      |

Die Assays verwenden TaqMan-Reagenzien für die Amplifikation und den Nachweis spezifischer Polymorphismen in aufgereinigten genomischen DNA-Proben (gDNA). Alle Assays wurden mithilfe einer firmeneigenen Assay-Design-Software entwickelt.

#### Produkt-eigenschaften

Für alle Custom TaqMan SNP Genotyping Assays gilt Folgendes:

- Sie müssen einen Submission File (mithilfe der File Builder-Software) mit der gewünschten SNP-Zielsequenz erstellen, der dem Custom TaqMan® Genomic Assays-Service vorgelegt werden muss.
- Sie benötigen drei Komponenten:
  - 1 bis 20 ng gereinigte gDNA-Proben pro Mikrotiterplatte

**Hinweis:** cDNA-Proben können verwendet werden. Applied Biosystems empfiehlt die Verwendung von cDNA mit den Custom TaqMan SNP Genotyping Assays zurzeit jedoch nicht.

- 40× SNP Genotyping Assay oder 80× SNP Genotyping Assay (spezifisch für jeden Polymorphismus). Jeder Assay enthält sequenzspezifische Forward- und Reverse-Primer für die Amplifizierung des betreffenden SNP sowie zwei TaqMan MGB-Sonden: eine mit dem Farbstoff VIC markierte Sonde zum Nachweis der Allel-1-Sequenz und eine mit dem Farbstoff FAM markierte Sonde zum Nachweis der Allel-2-Sequenz.
- TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase<sup>®</sup> UNG)
- Sie sind designed und optimiert für den TaqMan Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase UNG) und Universelle Thermocycling-Bedingungen.
- Sie erfordern eine PCR-Amplifikation und eine Endpunktmessung, um Ergebnisse zu erhalten.

### Weitere Informationen

- Informationen über die neuesten verfügbaren Produkte und jeweiligen Produktverwendungen finden Sie auf der Website von Applied Biosystems:  
**<http://www.appliedbiosystems.com/>**
  - a. Wählen Sie unter den TaqMan<sup>®</sup>-Produkten **TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays** aus.
  - b. Wählen Sie auf der Seite mit den SNP Genotyping Assays unter den kundenspezifischen Assays **Custom TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays** aus.
- Weitere Informationen zur Bestellung von kundenspezifischen TaqMan SNP-Genotypisierungs-Assays finden Sie in den *Custom TaqMan<sup>®</sup> Genomic Assays Protocol: Submission Guidelines*.
- Weitere Informationen über die Vorbereitung der PCR-Reaktionen mit den kundenspezifischen TaqMan SNP-Genotypisierungs-Assays finden Sie im *Custom TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays Protocol* (Protokoll zu kundenspezifischen TaqMan SNP-Genotypisierungs-Assays).

## Auswahl des Master-Mixes

**Verfügbare Master-Mixe** Assays von Applied Biosystems für die Genotypisierung, die auf Bestellung hergestellt werden, eignen sich zur Verwendung mit den folgenden TaqMan-Master-Mixen:

| Master-Mix   | Bestell-Nr. |
|--|-------------|
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, 200 Reaktionen                    | 4304437     |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, 2000 Reaktionen                   | 4326708     |
| 10er-Packung, TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix                      | 4305719     |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 200 Reaktionen  | 4324018     |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 2000 Reaktionen | 4326614     |
| 10er-Packung, TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG    | 4324020     |

**Hinweis:** Genotypisierungsanalysen werden bei Verwendung von TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix nicht unterstützt.

**Weitere Informationen** Weitere Informationen über die Verwendung der TaqMan Master Mixes finden Sie im *TaqMan® Universal PCR Master Mix-Protokoll*.

## Experimentelles Design

**StepOne-Software verwenden** Verwenden Sie bei kundenspezifischen Assays von Applied Biosystems für die Einrichtung des Analysedesigns Ihrer Genotypisierungsanalysen die StepOne-Software. Die StepOne-Software berechnet automatisch die Mengen für:

- Reaktionsmix-Komponenten
- Probenverdünnungen

**Hinweis:** Um einen SNP-Assay in der StepOne-Software auszuwählen, öffnen Sie den Bildschirm SNP-Assays im Arbeitsablauf des Analysedesign-Assistenten oder den Bildschirm Plate Setup (Platteneinrichtung) im Setup für Fortgeschrittene. Im Bildschirm SNP Assays oder Plate Setup (Platteneinrichtung) können Sie aus der Bibliothek einen Assay auswählen oder einen neuen Assay erstellen.

**Weitere Informationen** Weitere Informationen über das Design und die Durchführung von Genotypisierungsanalysen mit dem StepOne-System finden Sie im *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Einführungshandbuch zu Genotypisierungsanalysen*.

# Positiv/Negativ-Analysen

---

# 5

Dieses Kapitel umfasst die folgenden Themen:

|   |     |
|---|-----|
| Abschnitt 5.1 Informationen zu Positiv/Negativ-Analysen . . . . | 5-3 |
| Abschnitt 5.2 Design-Richtlinien . . . . .                      | 5-9 |



## Abschnitt 5.1 Informationen zu Positiv/Negativ-Analysen

---

Dieser Abschnitt umfasst die folgenden Themen:

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| Überblick .....              | 5-4 |
| Auswahl des Assay-Typs ..... | 5-5 |

## Überblick

### Definition einer Positiv/Negativ-Analyse

Bei einer Positiv/Negativ-Analyse handelt es sich um eine Endpunktanalyse, die Aufschluss über das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer bestimmten Nukleinsäuresequenz (Zielsequenz) in einer Probe gibt. Die tatsächliche Menge der Zielsequenz wird nicht festgestellt.

Positiv/Negativ-Analysen werden häufig zur Detektion des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins eines Erregers, z. B. Viren oder Bakterien, verwendet. Beispielsweise lassen sich mit Positiv/Negativ-Analysen *Salmonellen* in Hamburgerfleisch nachweisen. Die Ergebnisse der Analyse geben an, ob *Salmonellen* vorhanden sind oder nicht; die entsprechende Menge an Bakterien wird nicht festgestellt.

### Komponenten

PCR-Reaktionen für Positiv/Negativ-Analysen enthalten die folgenden Komponenten:

- **Probe:** Probenmaterial, in dem das Vorhandensein einer Zielsequenz bestimmt werden soll
- **Replikate:** identische Reaktionen mit identischen Komponenten und Volumina
- **Interne Positivkontrolle (IPC):** ein kurzes synthetisches DNA-Template, das zu PCR-Reaktionen hinzugegeben wird. Die IPC kann dazu verwendet werden, zwischen richtig negativen Ergebnissen und Reaktionen, die durch PCR-Inhibitoren, eine fehlerhafte Assay-Einrichtung oder einen Reagenzien- oder Gerätefehler beeinflusst wurden, zu unterscheiden.
- **Negativkontrolle mit blockierter IPC:** Wells, die in der PCR-Reaktion statt einer Probe einen IPC-Inhibitor enthalten. In den Negativkontrollen mit blockierter IPC sollte keine Amplifikation erfolgen, da die Reaktion kein Probenmaterial enthält und die Amplifikation der IPC unterdrückt wird.
- **Negativkontrolle mit IPC:** Wells, die in der PCR-Reaktion statt einer Probe ein IPC-Template und einen Puffer oder Wasser enthalten. In Negativkontrollen mit IPC sollte nur das IPC-Template amplifizieren, da die Reaktion kein Probenmaterial enthält.

**Hinweis:** Positiv/Negativ-Analysen können zwar ohne IPC durchgeführt werden, eine IPC stellt jedoch sicher, dass eine fehlgeschlagene PCR nicht fälschlich für ein negatives Testergebnis gehalten wird.

### Endpunktnachweis und Post-PCR-Plattenauswertung

Positiv/Negativ-Analysen sind Endpunktanalysen, in denen nach Abschluss der PCR Daten zur Fluoreszenz erhoben werden.

Zur Problembeseitigung bei Positiv/Negativ-Analysen kann das StepOne™ Real-Time PCR-System von Applied Biosystems für die Durchführung einer Real-Time PCR verwendet werden. Bei Verwendung des StepOne™-Systems für die PCR-Amplifikation müssen Prä-PCR- und Post-PCR-Messung separat durchgeführt werden.

## Wie funktionieren Positiv/Negativ-Analysen

Während der PCR binden die fluorogenen Sonden spezifisch an die komplementäre Zielsequenz zwischen dem Forward- und dem Reverse-Primer auf der Template-DNA. Anschließend schneidet die AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase während der Extension die hybridisierten Sonden in jenen Proben ab, die die Zielsequenz enthalten. Durch die Spaltung jeder perfekt passenden Sonde wird der Reporter vom Quencher entfernt und die Fluoreszenz des Reporters steigt an.

Nach Abschluss der PCR-Zyklen misst das StepOne™-System die während der PCR-Amplifikation entstandene Fluoreszenz. Die Fluoreszenzsignale werden für die Bestimmung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins der Zielsequenz in jeder Probe verwendet. Die Reportersignale werden wie folgt auf die Emission einer passiven Referenz normiert:

$$R_{n(TT)} = \frac{\text{Emissionsintensität der Zielsequenz}}{\text{Emissionsintensität der passiven Referenz}}$$

$$R_{n(IPC)} = \frac{\text{Emissionsintensität der internen Positivkontrolle}}{\text{Emissionsintensität der passiven Referenz}}$$

### Verwendung einer IPC

Eine IPC besteht aus einem zweiten TaqMan®-Sonden- und -Primer-Set, das der Reaktionsplatte hinzugefügt wird, um eine in niedriger Kopienzahl vorhandene konstitutive Nukleinsäure nachzuweisen. Die IPC und die Zielsequenz werden gleichzeitig auf derselben Reaktionsplatte amplifiziert. Wenn ein Well keine Amplifikation aufweist, verwendet die StepOne™-Software das positive Signal der IPC, um zu bestätigen, dass die fehlende Amplifikation auf eine fehlenden Zielsequenz zurückzuführen ist und nicht auf einen Pipettierfehler oder eine Inhibition.

**Hinweis:** Positiv/Negativ-Analysen können zwar ohne IPC durchgeführt werden, eine IPC stellt jedoch sicher, dass eine fehlgeschlagene PCR nicht fälschlich für ein negatives Testergebnis gehalten wird.

**Arbeitsablauf** Bereiten Sie die Positiv/Negativ-Analysen vor ihrer Ausführung auf dem StepOne-System folgendermaßen vor:

1. Wählen Sie den Assay-Typ aus (siehe unten).
2. Prüfen Sie die Design-Richtlinien für den ausgewählten Assay-Typ (Abschnitt 5.2 auf Seite 5-9).

## Auswahl des Assay-Typs

Bei der Einrichtung Ihres Analysedesigns mit der StepOne-Software können Sie zwischen den folgenden Assay-Typen für Positiv/Negativ-Analysen wählen:

- Inventoried/Made to Order (Inventarisiert/Auf Bestellung, Seite 5-6)
- Custom (Kundenspezifisch, Seite 5-7)

In diesem Abschnitt werden die für jeden Assay-Typ verfügbaren Produkte aufgelistet.

**Hinweis:** Die Assays sind für die jeweiligen Zielsequenzen spezifisch. Die Master-Mixe enthalten die übrigen für die PCR-Reaktion benötigten Komponenten.

**Hinweis:** TaqMan® Fast-Reagenzien und SYBR® Green-Reagenzien können nicht für Positiv/Negativ-Analysen verwendet werden.

**Assays  
Inventarisiert/  
Auf Bestellung**

| Produkt  | Eigenschaften   |
|--|---|
| TaqMan® Gene Expression Assays   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• vorentworfene, genspezifische Primer- und Sonden-Sets für Gene von Mensch, Maus, Ratte, <i>Arabidopsis</i>, <i>Drosophila</i>, <i>C. elegans</i>, <i>C. familiares</i> (Hund) und Rhesusaffe</li> <li>• verfügbar im praktischen Ein-Röhrchen-Format als inventarisierte Assays oder als Assays auf Bestellung</li> </ul>                  |
| TaqMan® Endogenous Control Assays<br><br><b>Hinweis:</b> TaqMan Endogenous Control Assays sind den inventarisierten TaqMan Gene Expression Assays beigruppert. | <ul style="list-style-type: none"> <li>• optimierte, vorformulierte und gebrauchsfertige endogene Kontroll-Assays</li> <li>• kostengünstige Genexpressionsquantifizierung bei Mensch, Maus, Ratte, <i>Arabidopsis</i>, <i>Drosophila</i> und allen eukaryotischen Spezies</li> <li>• Auswahl zwischen FAM™-Farbstoff- oder VIC®-Farbstoffmarkierungen (primer-limitiert)</li> </ul> |
| Custom TaqMan® Gene Expression Assays  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• für alle Spezies oder Organismen</li> <li>• Zielsequenz Ihrer Wahl</li> <li>• praktisches Ein-Röhrchen-Format</li> </ul>   |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase® UNG)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• bietet eine optimale Leistung bei TaqMan®-Assays, die cDNA oder DNA als Template verwenden</li> <li>• enthält Komponenten zur Sicherstellung einer hervorragenden Assay Performance</li> <li>• die Verwendung eines Reagenz für alle Assays vereinfacht den Prozess der Assay-Implementierung</li> </ul>                                   |

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.

Hinweise zur Einrichtung Ihres Analysedesigns für inventarisierte oder auf Bestellung erhältliche Assays finden Sie auf Seite 5-10.

**Eigene (kunden-  
spezifische)  
Assays**

| <b>Produkt</b>  | <b>Eigenschaften</b>  |
|---|---|
| Custom TaqMan®-Sonden und -Primer                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• für alle Spezien oder Organismen</li> <li>• Auswahl an Farbstoffmarkierungen, Quenchern und Synthesemaßstäben</li> <li>• zur Verwendung mit der Primer Express®-Software und den Hinweisen zum Assay-Design von Applied Biosystems</li> </ul>  |
| Primer Express®-Software  | Software für das Design von Primern und Sonden für Real-Time PCR  |
| TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase® UNG) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• bietet eine optimale Leistung bei TaqMan®-Assays, die cDNA oder DNA als Template verwenden</li> <li>• enthält Komponenten zur Sicherstellung einer hervorragenden Assay Performance</li> <li>• die Verwendung eines Reagenz für alle Assays vereinfacht den Prozess der Assay-Implementierung</li> </ul> |

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.

Hinweise zur Einrichtung Ihres Analysedesigns für eigene (kundenspezifische) Assays finden Sie auf Seite 5-15.



---

## Abschnitt 5.2 Design-Richtlinien

---

Dieser Abschnitt umfasst die folgenden Themen:

|  |      |
|--|------|
| Assays Inventarisiert/Auf Bestellung . . . . .                 | 5-10 |
| TaqMan® Gene Expression Assays . . . . .                       | 5-10 |
| Custom TaqMan® Gene Expression Assays . . . . .                | 5-12 |
| TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents . . . . . | 5-13 |
| Auswahl des Master-Mixes . . . . .                             | 5-14 |
| Experimentelles Design. . . . .                                | 5-15 |
| Eigene (kundenspezifische) Assays . . . . .                    | 5-15 |

## Assays Inventarisiert/Auf Bestellung

**Arbeitsablauf** Bei Auswahl des Assay-Typs Inventarisiert/Auf Bestellung in der StepOne™-Software empfiehlt Applied Biosystems die Einhaltung des unten aufgeführten Arbeitsablaufs:

1. Wählen Sie den Assay aus:
  - TaqMan® Gene Expression Assays (unten)
  - Custom TaqMan® Gene Expression Assays (Seite 5-12).
2. Verwenden Sie die TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents (Seite 5-13).

**Hinweis:** Positiv/Negativ-Analysen können zwar ohne IPC durchgeführt werden, eine IPC stellt jedoch sicher, dass eine fehlgeschlagene PCR nicht fälschlich für ein negatives Testergebnis gehalten wird.

3. Wählen Sie den Master-Mix aus (Seite 5-14).
4. Richten Sie das Analysedesign mit der StepOne-Software ein (Seite 5-15).

## TaqMan® Gene Expression Assays

**Produktbeschreibung** TaqMan® Gene Expression Assays sind eine umfassende Kollektion an inventarisierten bzw. Sonden- und Primersets auf Bestellung zur Durchführung von Positiv-/Negativ-Analysen für Gene von Mensch, Maus, Ratte, *Arabidopsis*, *Drosophila*, *C. elegans*, *C. familiares* (Hund) und Rhesusaffe.

Jeder Assay wird nach einem automatisierten Design und in einem qualitätskontrollierten Prozess erstellt. Inventarisierte Assays werden hergestellt und auf Lager gehalten, während Assays auf Bestellung vorentworfen und erst bei Bestellung hergestellt werden.

**Produkt-eigenschaften** Für alle TaqMan Gene Expression Assays gilt Folgendes:

- Sie benötigen drei Komponenten:
  - 1 bis 100 ng an cDNA-Probe (umgewandelt aus RNA) pro Well, wobei alle Wells in einer Studie die gleiche Menge an cDNA enthalten.
  - 20X Gene Expression Assay Mix (für jede Zielsequenz spezifisch). Jeder Assay-Mix besteht aus zwei unmarkierten PCR-Primern und einer mit FAM™-Farbstoff markierten TaqMan® MGB (Minor Groove Binder)-Sonde in einem gebrauchsfertigen 20X-Mix. 1X-Endkonzentrationen betragen 250 nM für die Sonde und 900 nM für jeden Primer.
  - TaqMan® Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase® UNG).
- Sie sind designed und optimiert für den TaqMan Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase UNG) und die Universellen Thermocycling-Bedingungen.
- Amplifizieren Sie nach Möglichkeit Ziel-cDNA, ohne genomische DNA (*m*-Suffix in Assay-ID) zu amplifizieren, indem Sie Sonden entwerfen, die Exon-Exon-Grenzen überschreiten.

**Verfügbare Assays**

TaqMan Gene Expression Assays sind für Gene von Mensch, Maus, Ratte, *Arabidopsis*, *Drosophila*, *C. elegans*, *C. familiares* (Hund) und Rhesusaffe verfügbar. Es gelten die folgenden Bestellnummern:

- BN 4331182 für inventarisierte Assays
- BN 4351372 für Assays auf Bestellung

Das Präfix des Assay-Namens gibt die Spezies an, für die der Assay entworfen wurde: *Hs* für *Homo sapiens* (Mensch), *Mm* für *Mus musculus* (Maus), *Rn* für *Rattus norvegicus* (Ratte), *At* für *Arabidopsis thaliana*, *Dm* für *Drosophila melanogaster*, *Ce* für *C. elegans*, *Cf* für *C. familiares* (Hund) und *Rh* für Rhesusaffe.

Das Suffix des Assay-Namens gibt entsprechend der unten stehenden Tabelle die Assay-Platzierung an.

| Suffix     | Beschreibung   |
|------------|--|
| <i>_m</i>  | Die Sonde des Assays überschreitet eine Exon-Grenze; das Assay detektiert keine genomische DNA.  |
| <i>_s</i>  | Die Primer und Sonden des Assays befinden sich innerhalb eines einzigen Exons; das Assay detektiert genomische DNA.  |
| <i>_g</i>  | Die Primer und Sonden des Assays befinden sich eventuell innerhalb eines einzigen Exons; das Assay detektiert eventuell genomische DNA.  |
| <i>_mH</i> | Der Assay wurde für ein Transkript einer Genfamilie mit hoher Sequenzhomologie entwickelt. Der Assay liefert einen Unterschied zwischen dem Zielgen und dem Gen mit der nächsten Sequenzhomologie von 10 C <sub>T</sub> bis 15 C <sub>T</sub> . Deswegen detektiert der Assay das Zieltranskript mit einer 1000- bis 3000-fach höheren Empfindlichkeit (Sensitivität) als das nächste homologe Transkript, wenn beide in gleicher Kopienzahl in einer Probe vorliegen. |
| <i>_sH</i> |  |
| <i>_gH</i> |  |
| <i>_u</i>  | Das Amplikon des Assays überschreitet eine Exon-Grenze und die Sonde befindet sich vollständig innerhalb eines der betreffenden Exons.   |

**TaqMan® Endogenous Control Assays**

TaqMan® Endogenous Control Assays sind mit den Inventorized TaqMan Gene Expression Assays (BN 4331182) gruppiert. TaqMan Endogenous Control Assays sind für die folgenden Zwecke verfügbar:

- als TaqMan Gene Expression Assay mit einer mit dem Farbstoff FAM<sup>TM</sup> markierten TaqMan-MGB-Sonde als gebrauchsfertige Mischung in einem 20X-Röhrchen
- entweder mit VIC<sup>®</sup>-Farbstoff markierte oder mit FAM<sup>TM</sup>-Farbstoff markierte TaqMan MGB-Sonden für alle Spezies von Mensch, Maus und Ratte. TaqMan Endogenous Controls mit VIC-Farbstoff sind primer-limitiert.

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA<sup>TM</sup>-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.

### Weitere Informationen

- Informationen über die neuesten verfügbaren Produkte und jeweiligen Produktanwendungen finden Sie auf der Website von Applied Biosystems:  
**<http://www.appliedbiosystems.com/>**
  - a. Wählen Sie auf der Website unter TaqMan<sup>®</sup> Products die Option **TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays**.
  - b. Wählen Sie auf der Seite Gene Expression Assays & Arrays unter Individual Assays (Einzelne Assays) die Option **TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays**.
- Informationen über Custom TaqMan Endogenous Control Assays finden Sie im Anwendungshinweis *Using TaqMan<sup>®</sup> Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies*.
- Informationen über das Ansetzen von PCR-Reaktionen mit den TaqMan Gene Expression Assays finden Sie im *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays Protocol*.

## Custom TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays

### Produktbeschreibung

Custom TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays sind TaqMan-Sonden- und Primersets, die vom Custom TaqMan<sup>®</sup> Genomic Assays Service aufgrund der vom Kunden bereitgestellten Sequenzinformationen entworfen, synthetisiert und formuliert werden. Custom TaqMan Gene Expression Assays ermöglichen Positiv/Negativ-Analysen aller Gene oder Spleißvarianten in jedem Organismus.

Die Assays verwenden TaqMan-Reagenzien für die Amplifikation und den Nachweis der Zielsequenz in cDNA-Proben. Alle Assays wurden mithilfe einer firmeneigenen Assay-Design-Software entwickelt.

### Produkt-eigenschaften

Für alle Custom TaqMan Gene Expression Assays gilt Folgendes:

- Sie müssen einen „Submission File“ (mit der Freeware File Builder) mit Ihrer Zielsequenz erstellen und diese Datei beim Custom TaqMan Genomic Assays-Service einreichen.
- Sie benötigen drei Komponenten:
  - 1 bis 100 ng an cDNA-Probe (umgewandelt aus RNA) pro Well, wobei alle Wells in einer Studie die gleiche Menge an cDNA enthalten.
  - 20X Gene Expression Assay oder 60X Gene Expression Assay (spezifisch für die jeweilige Zielsequenz). Jeder Assay besteht aus zwei zielsequenzspezifischen Primern und einer mit FAM<sup>™</sup>-Farbstoff markierten TaqMan MGB-Sonde in einem gebrauchsfertigen 20-fachen oder 60-fachen Mix. 1X-Endkonzentrationen betragen 250 nM für die Sonde und 900 nM für jeden Primer.
  - TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase<sup>®</sup> UNG).

Sie sind designed und optimiert für den TaqMan Universal PCR Master Mix (mit oder ohne AmpErase UNG) und die Universellen Thermocycling-Bedingungen.

**Weitere Informationen**

- Informationen über die neuesten verfügbaren Produkte und jeweiligen Produktanwendungen finden Sie auf der Website von Applied Biosystems:  
**<http://www.appliedbiosystems.com/>**
  - a. Wählen Sie auf der Website unter TaqMan® Products die Option **TaqMan® Gene Expression Assays**.
  - b. Wählen Sie auf der Seite Gene Expression Assays & Arrays (Genexpressions-Assays und –Arrays) unter Individual Assays (Einzelne Assays) die Option **Custom TaqMan® Gene Expression Assays**.
- Informationen über die Bestellung von Custom TaqMan Gene Expression Assays finden Sie im *Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol: Submission Guidelines*.
- Informationen über das Ansetzen von PCR-Reaktionen mit den Custom TaqMan Gene Expression Assays finden Sie im *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*.

**TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents****Produktbeschreibung**

Die TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents von Applied Biosystems enthalten die folgenden Komponenten:

- eine interne Positivkontrolle (IPC) mit vorentworfenen Primern und Sonden
- ein IPC-DNA-Template
- einen IPC-Inhibitor

Die Reagenzien wurden für folgende Zwecke entwickelt:

- Bewertung von negativen Analyseergebnissen:
  - Ist das Ergebnis für die Zielsequenz negativ und das Ergebnis für die IPC positiv, wird bestätigt, dass keine Zielsequenz vorhanden ist.
  - Ist das Ergebnis sowohl für die Zielsequenz als auch für die IPC negativ, so zeigt dies, eine PCR-Hemmung an.
- Vermeidung der Amplifikation endogener Kontrollen
- erlaubt die gleichzeitige Amplifikation von IPC und Zielsequenz, ohne dass die Amplifikation der Zielsequenz gestört würde
- Nachweis der IPC mithilfe einer VIC®-Farbstoff markierten Sonde
- Nachweis der Zielsequenz mithilfe einer mit FAM™-Farbstoff markierten Sonde

**Produkt-eigenschaften**

Für die TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents-Kits gilt Folgendes:

- Es werden die folgenden Komponenten benötigt:
  - DNA-Probenmaterial
  - TaqMan-Assay für die zu untersuchende Zielsequenz
  - TaqMan® 2× Universal PCR Master Mix
- designed und optimiert für den TaqMan 2 × Universal PCR Master Mix und die Universellen Thermocycling-Bedingungen.

**Verfügbare Kits** Die folgenden TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents-Kits sind bei Applied Biosystems verfügbar:

| Kits  | Bestell-Nr. |
|---|-------------|
| TaqMan <sup>®</sup> Exogenous Internal Positive Control Reagents mit TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix (mit VIC <sup>®</sup> -Farbstoff)  | 4308320     |
| TaqMan <sup>®</sup> Exogenous Internal Positive Control Reagents<br><b>Hinweis:</b> Bei Verwendung dieses Kits muss eines der folgenden TaqMan <sup>®</sup> -Reagenzien separat erworben werden: <ul style="list-style-type: none"> <li>• TaqMan<sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix (BN 4304437)</li> <li>• TaqMan<sup>®</sup> PCR Core Reagents Kit (BN N808-0228)</li> </ul> | 4308323     |

**Weitere Informationen** Weitere Informationen über das Ansetzen von PCR-Reaktionen mit TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents finden Sie im *TaqMan<sup>®</sup> Exogenous Internal Positive Control Reagents Protocol*.

## Auswahl des Master-Mixes

**Verfügbare Master-Mixe** Assays (Inventarisiert/Auf Bestellung) von Applied Biosystems für Positiv/Negativ-Analysen eignen sich zur Verwendung mit den folgenden TaqMan<sup>®</sup>-Master-Mixen:

| Master-Mix   | Bestell-Nr. |
|--|-------------|
| TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix, 200 Reaktionen                                | 4304437     |
| TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix, 2000 Reaktionen                               | 4326708     |
| 10er-Packung, TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix                                  | 4305719     |
| TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase <sup>®</sup> UNG, 200 Reaktionen  | 4324018     |
| TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase <sup>®</sup> UNG, 2000 Reaktionen | 4326614     |
| 10er-Packung, TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase <sup>®</sup> UNG    | 4324020     |
| TaqMan <sup>®</sup> PCR Core Reagents Kit  | N808-0228   |

**Hinweis:** Bei Bestellung der TaqMan<sup>®</sup> Exogenous Internal Positive Control Reagents mit dem TaqMan<sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix-Kit (BN 4308320) muss der Master-Mix nicht separat erworben werden.

**Hinweis:** Positiv/Negativ-Analysen werden bei Verwendung von TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR Master Mix nicht unterstützt.

**Weitere Informationen** Informationen zur Verwendung der TaqMan-Reagenzien finden Sie im *TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix Protocol*.

## Experimentelles Design

**StepOne-Software verwenden** Verwenden Sie für inventarisierte bzw. auf Bestellung erhältliche Assays von Applied Biosystems die StepOne-Software zum Einrichten Ihrer Positiv/Negativ-Analysen. Die StepOne-Software berechnet automatisch die Mengen für:

- Reaktionsmix-Komponenten
- Kontrollen und Proben
- Probenverdünnungen

**Hinweis:** Um den Assay-Typ Inventarisiert/Auf Bestellung in der StepOne-Software auszuwählen, öffnen Sie im Bildschirm Reaction Setup (Pipettierprotokoll) entweder den Design Wizard (Analysedesign-Assistent) oder den Arbeitsablauf Advanced Setup (Setup für Fortgeschrittene). Wählen Sie dann aus dem Dropdown-Menü Assay Type (Assay-Typ) die Option **Inventorized/Made to Order** (Inventarisiert/Auf Bestellung).

**Weitere Informationen** Informationen über das Design und die Durchführung von Positiv/Negativ-Analysen mit dem StepOne-System finden Sie im *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments*.

## Eigene (kundenspezifische) Assays

**Arbeitsablauf** Wenn Sie den kundenspezifischen Assay-Typ in der StepOne™-Software für eine Positiv/Negativ-Analyse auswählen (d. h. wenn Sie Ihre eigenen Primer und Sonden entwerfen), empfiehlt Applied Biosystems, die Richtlinien zum Assay-Design von Applied Biosystems zu befolgen:

1. Entwerfen Sie Primer und Sonden mit der Primer Express® Software (Seite 3-23).
2. Wählen Sie den geeigneten Reagenzientyp aus (Seite 3-26).

**WICHTIG!** Applied Biosystems rät von der Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne-System ab.

**Hinweis:** TaqMan® Fast-Reagenzien und SYBR® Green-Reagenzien können nicht für Positiv/Negativ-Analysen verwendet werden.

3. Verwenden Sie die empfohlenen Thermocycling-Bedingungen (Seite 3-28).

4. Beginnen Sie mit den Standardkonzentrationen für Primer und Sonden. Optimieren Sie bei Bedarf die Primer- (Seite 3-31) und Sondenkonzentrationen (Seite 3-34).

**WICHTIG!** Diese Schritte führen nur dann schnell und zuverlässig durch das Design und die Optimierung von Assays, wenn sie in ihrer Gesamtheit angewendet werden. Die höchste Erfolgsquote erzielen Sie beim Einhalten der gesamten Abfolge. Eine detaillierte Beschreibung der Richtlinien von Applied Biosystems zum Assay-Design (Assay Design Guidelines) finden Sie in Anhang C.

**Hinweis:** Um den kundenspezifischen Assay-Typ in der StepOne-Software auszuwählen, öffnen Sie im Bildschirm Reaction Setup (Pipettierprotokoll) entweder den Design Wizard (Analysedesign-Assistent) oder den Arbeitsablauf Advanced Setup (Setup für Fortgeschrittene). Wählen Sie dann aus dem Dropdown-Menü Assay Type (Assay-Typ) die Option **Custom** (Kundenspezifisch).

## Formel für vergleichende $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ )-Analysen

**Formel** Die auf eine endogene Kontrolle normalisierte und zu einer Referenzprobe relative Zielsequenzmenge wird anhand der folgenden Formel berechnet:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

**Herleitung der Formel** Die folgende Gleichung beschreibt die exponentielle Amplifikation der PCR:

$$X_n = X_o \times (1 + E_X)^n$$

wobei gilt:

- $x_n$  = Anzahl der Zielmoleküle in Zyklus n
- $x_o$  = ursprüngliche Anzahl der Zielmoleküle
- $E_x$  = Effizienz der Amplifikation der Zielsequenz
- n = Anzahl der Zyklen
- $X_o$  = ursprüngliche Anzahl der Zielmoleküle

Der Schwellenwert-Zyklus ( $C_T$ ) gibt die fraktionelle Zyklenzahl an, in denen die Menge der amplifizierten Zielsequenz einen bestimmten Schwellenwert erreicht. Dies wird in der folgenden Gleichung ausgedrückt:

$$X_T = X_o \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X$$

wobei gilt:

- $x_T$  = Schwellenwert-Anzahl der Zielmoleküle
- $C_{T,X}$  = Schwellenwert-Zyklus für Zielsequenzamplifikation
- $K_X$  = konstant

Die endogene Kontrollreaktion wird mit einer ähnlichen Gleichung beschrieben:

$$R_T = R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

wobei gilt:

- $R_T$  = Schwellenwert - Anzahl der Referenzmoleküle
- $R_o$  = ursprüngliche Anzahl der Referenzmoleküle
- $E_R$  = Effizienz der Referenzamplifikation
- $C_{T,R}$  = Schwellenwert-Zyklus der Referenzamplifikation

- $K_R = \text{konstant}$

Bei der Division von  $X_T$  durch  $R_T$  erhält man die folgende Formel:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_o \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$

Die exakten Werte von  $X_T$  und  $R_T$  hängen u. a. von den folgenden Faktoren ab:

- Wahl des in der Sonde verwendeten Reporterfarbstoffs
- Auswirkungen des Sequenzkontexts auf die Fluoreszenzeigenschaften der Sonde
- Effizienz der Sondenspaltung
- Reinheit der Sonde
- Einstellung des Fluoreszenz-Schwellenwerts

Deswegen muss die Konstante  $K$  nicht gleich 1 sein.

Bei Annahme der gleichen Effizienz von Zielsequenz und Referenz gilt die folgende Gleichung:

$$E_X = E_R = E$$

$$\frac{X_o}{R_o} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K$$

oder

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

wobei gilt:

- $X_N = X_o/R_o$ , die normalisierte Zielsequenzmenge
- $\Delta C_T = C_{T,X} - C_{T,R}$ , die Differenz in Schwellenwert-Zyklen für Zielsequenz und Referenz

Durch Umstellung ergibt sich die folgende Formel:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

Der letzte Schritt ist die Division des  $X_N$ -Werts für eine Probe (q) durch den  $X_N$ -Wert für die Referenzprobe (cb):

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

wobei gilt:

- $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$

Für gemäß den Hinweisen zum Assay-Design von Applied Biosystems entworfene und optimierte Amplikons (Amplikongröße <150 bp) ist die Effizienz fast 1. Deswegen wird die zu einer endogenen Kontrolle und zu einer Referenzprobe relative Zielsequenzmenge mit der folgenden Formel ermittelt:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$



Zur Erstellung eines exakten Multiplex-Assays ist es wichtig, dass die Amplifikation einer Spezies nicht die der anderen dominiert. Ansonsten kann die Amplifikation einer sehr abundanten Spezies eine effiziente Amplifikation der weniger abundanten Spezies verhindern. Wenn die weniger abundante Spezies nicht effizient amplifiziert wird, kann Ihre Analyse ungenaue Ergebnisse liefern. In besonders schweren Fällen kann die Detektion einer weniger abundanten Spezies auch ganz verhindert werden. Sie können diese Situation durch eine Limitierung der für die Amplifikation der abundanten Spezies verwendeten Primerkonzentrationen vermeiden. Dadurch wird die Amplifikation kurz nach Erfassung des  $C_T$ -Werts „ausgeschaltet“.

Dank Primer-Limitierung werden die von beiden Assays benötigten Reaktionskomponenten nicht erschöpft, so dass eine Amplifikation der weniger abundanten Spezies mit hoher Effizienz fortgesetzt werden kann. Wenn die abundantere Spezies nicht bekannt ist, sollten Sie sie vor der Ausführung einer Multiplex-PCR bestimmen, indem Sie beide Zielsequenzen in verschiedenen Reaktionsgefäßen messen. Beide Amplifikationen sollten primer-limitiert sein, wenn keine der beiden Spezies konstant in höherer Abundanz vorhanden ist.

**Relative  
Abundanz von  
Zielsequenz und  
Referenz  
berücksichtigen**

Bei Anwendung der Primer-Limitierung auf die Amplifikationen von Zielsequenz und endogener Kontrolle ist die relative Abundanz der beiden Spezies zu berücksichtigen. In Quantifizierungsanalysen kann rRNA als endogene Kontrolle verwendet werden. Die Konzentration von rRNA innerhalb der Gesamt-RNA ist immer größer als die Konzentration einer Ziel-mRNA. Deswegen müssen in Multiplex-Reaktionen, die sowohl Zielsequenz als auch rRNA amplifizieren, nur die Konzentrationen der rRNA-Primer limitiert werden.

**Matrix zur Primer-Limitierung**

Um die Konzentrationen der limitierenden Primer zu definieren, führen Sie unter Verwendung der minimal zu erwartenden Anfangskonzentration des Templates eine Matrix der Konzentrationen von Forward und Reverse Primer aus. Ziel ist die Ermittlung von Primerkonzentrationen, die den  $\Delta R_n$ -Wert des Assays reduzieren, ohne sich auf den  $C_T$ -Wert auszuwirken. Die unten stehende Tabelle zeigt eine empfohlene Matrix für Forward und Reverse Primer mit Konzentrationen zwischen 20 bis 100 nM.

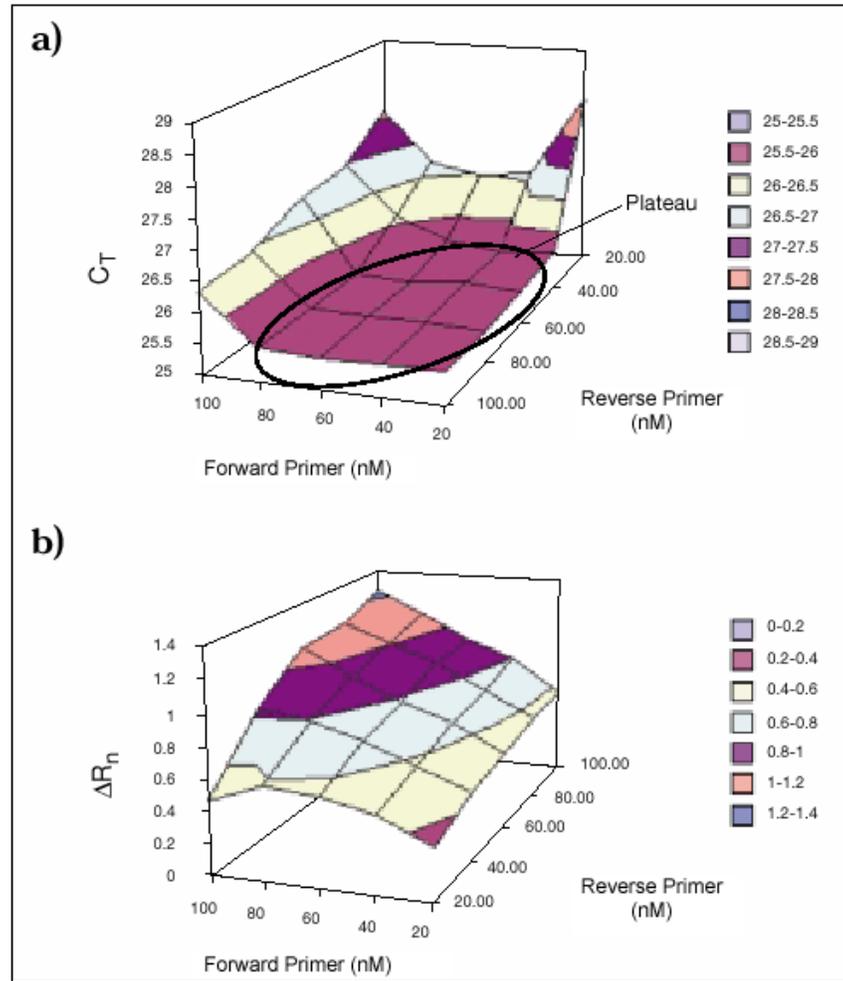
**Hinweis:** Obwohl die Einhaltung aller Design-Kriterien die Fähigkeit zur Identifizierung von limitierenden Primerkonzentrationen vereinfacht, ist dies vielleicht nicht für alle Assays möglich. Wenn bei einer Analyse der Matrix zur Primer-Limitierung die limitierenden Primerkonzentrationen nicht ermittelt werden können, muss zumindest ein Primer neu entworfen oder die Reaktionen in separaten Röhren durchgeführt werden.

|                      |                  |                 |                 |                 |                 |
|----------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Forward:<br>Reverse: | 100 nM<br>100 nM | 100 nM<br>80 nM | 100 nM<br>60 nM | 100 nM<br>40 nM | 100 nM<br>20 nM |
| Forward:<br>Reverse: | 80 nM<br>100 nM  | 80 nM<br>80 nM  | 80 nM<br>60 nM  | 80 nM<br>40 nM  | 80 nM<br>20 nM  |
| Forward:<br>Reverse: | 60 nM<br>100 nM  | 60 nM<br>80 nM  | 60 nM<br>60 nM  | 60 nM<br>40 nM  | 60 nM<br>20 nM  |
| Forward:<br>Reverse: | 40 nM<br>100 nM  | 40 nM<br>80 nM  | 40 nM<br>60 nM  | 40 nM<br>40 nM  | 40 nM<br>20 nM  |
| Forward:<br>Reverse: | 20 nM<br>100 nM  | 20 nM<br>80 nM  | 20 nM<br>60 nM  | 20 nM<br>40 nM  | 20 nM<br>20 nM  |

**Beispiel** Die Ergebnisse einer Analyse der Matrix zur Primer-Limitierung werden in Abbildung B-1 auf Seite B-3 gezeigt:

- Abbildung B-1a zeigt, dass signifikante Auswirkungen auf den  $C_T$ -Wert nur bei einer Verringerung der Primerkonzentrationen auf unter ca. 50 nM festgestellt wurden. Der Plateau-Bereich macht den Bereich deutlich, in dem geeignete limitierende Primerkonzentrationen gefunden werden können. In diesem Bereich bleibt der  $C_T$ -Wert (und deswegen der entsprechende Quantifizierungswert) unverändert, während der  $\Delta R_n$ -Wert und die dazugehörige Produktausbeute signifikant verringert werden.
- Abbildung B-1b zeigt die entsprechende Beziehung zwischen Primerkonzentrationen und  $\Delta R_n$ -Wert. Das Schaubild zeigt, dass niedrige Produktausbeuten durch eine Verringerung der Konzentrationen an Forward und Reverse Primer erzielt werden können.

In diesem Beispiel wären limitierende Primerkonzentrationen von mindestens 50 nM Forward und Reverse Primer die geeignete Wahl. Die Sondenkonzentration sollte auf einem optimalen Niveau gehalten werden, auch wenn ein Assay primer-limitiert ist, um sicherzustellen, dass das erzeugte Signal für exaktes Multicomponenting durch die Software ausreicht.



**Abbildung B-1 Ergebnisse der Analyse der Matrix zur Primer-Limitierung**  
**(a)** Zeigt die Änderungen des  $C_T$ -Werts durch variierenden Konzentrationen an Forward und Reverse Primer. Der angezeigte Plateau-Bereich gibt an, wo der  $C_T$  Wert konstant bleibt.  
**(b)** Zeigt eine Verringerung der  $\Delta R_n$  Werte bei abnehmender Primerkonzentration



# Richtlinien zum Assay-Design (Assay Design Guidelines)



## Informationen zu den Assay Design Guidelines

Wenn Sie das Design Ihrer Assays (Primer und Sonden) selbst durchführen möchten, empfiehlt Applied Biosystems die Einhaltung der Richtlinien zum Assay-Design von Applied Biosystems. Diese Richtlinien (Assay Design Guidelines) enthalten Angaben zu den folgenden Themen:

1. **Design von Primern und Sonden mit der Primer Express® Software:** Die Primer Express-Software verwendet mehrere Standardparameter zur automatischen Auswahl der Primer- und SONDENSSETS.
2. **Auswahl der geeigneten Reagenzien:** Es sind verschiedene TaqMan®- und SYBR® Green-Reagenzien verfügbar. Die Wahl der Reagenzien hängt vom Assay-Typ ab.
3. **Verwendung der empfohlenen Thermocycling-Bedingungen:** Verwenden Sie die für Ihre Probe empfohlenen Thermocycling-Bedingungen (DNA/cDNA, RNA für 1-Schritt-PCR und RNA für 2-Schritt-PCR).

**Hinweis:** Die Thermocycling-Bedingungen für Fast-Reagenzien unterscheiden sich von den Thermocycling-Bedingungen für Standardreagenzien.

4. **Verwendung von Standardkonzentrationen für Primer und Sonde:** Wenn Sie die Hinweise zum Assay-Design von Applied Biosystems befolgen, können Sie für optimierte und nicht im Multiplex-Verfahren ausgeführte Assays entweder Standardkonzentrationen für Primer und Sonde verwenden oder die Primer- und SONDENKONZENTRATIONEN optimieren.

**WICHTIG!** Diese Schritte führen nur dann schnell und zuverlässig durch das Design und die Optimierung von Assays, wenn sie in ihrer Gesamtheit angewendet werden. Die höchste Erfolgsquote erzielen Sie beim Einhalten der gesamten Abfolge.

**Hinweis:** Die Hinweise zum Assay-Design von Applied Biosystems garantieren nicht das gleiche Maß an Leistung und Sensitivität für alle Assays. Selbst die genauesten Design-Parameter können nicht alle möglichen Variationen zwischen zwei Assay-Systemen berücksichtigen.

## Schlussfolgerungen für Quantifizierungsanalysen

Im Allgemeinen gelten bei der Verwendung der Richtlinien zum Assay-Design für Quantifizierungsanalysen die folgenden Schlussfolgerungen:

- Für die meisten TaqMan-Assays garantiert eine Konzentration von 900 nM Primer und 250 nM Sonde einen empfindlichen Assay mit hoher Reproduzierbarkeit, wenn DNA oder cDNA als Template verwendet wird.
- Aufgrund des unspezifischen Charakters der Detektion sollte die SYBR® Green I-Farbstoff-Primeroptimierung nur mit großer Vorsicht umgangen werden. Bei Beachtung aller Hinweise wird jedoch mit Konzentrationen von 50 nM an Forward und Reverse Primer im Allgemeinen eine stabile Amplifikation mit einer hohen Spezifität erzielt, wenn DNA oder cDNA als Template verwendet wird. Verifizieren Sie diese Voraussetzung durch eine Prüfung auf unspezifische Produktformation mittels einer Schmelzkurven- oder Gelanalyse.

- Die meisten TaqMan-Assays ermöglichen eine Detektion und genaue Quantifizierung von <50 Kopien einer Zielsequenz, wobei sogar noch eine größere Sensitivität möglich ist.
- SYBR Green-Assays können zwar ähnliche Leistungen erzielen, unspezifische Produktformation kann jedoch die untere Detektionsgrenze erhöhen.

**Schluss-  
folgerungen  
für Geno-  
typisierungs-  
analysen**

Im Allgemeinen gelten bei der Verwendung der Hinweise zum Assay-Design für Genotypisierungsanalysen die folgenden Schlussfolgerungen:

Sie können 900-nM-Primer, eine 200-nM-Sonde und 1 bis 20 ng genomischer DNA verwenden, um empfindliche Assay-Ergebnisse mit hoher Reproduzierbarkeit zu erzielen.

# Bibliografie

- Afonina, I., Zivarts, M., Kutyavin, I., *et al.* 1997. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 25:2657–2660.
- Förster, V. T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physics (Leipzig)* 2:55–75.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10:413–417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. 1993. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026–1030.
- Kutyavin, I.V., Lukhtanov, E.A., Gamper, H.B., and Meyer, R.B. 1997. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res.* 25:3718–3723.
- Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods* 25:402–408.
- Longo, M.C., Berninger, M.S., and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125–128.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.* 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.



# Glossar

|   |  |
|---|--|
| <b>AIF</b>                                    | Abkürzung für Assay-Informationsdatei.   |
| <b>Allel</b>                                  | Eine der verschiedenen in der Population auftretenden Ausprägungen einer bestimmten Zielsequenz.   |
| <b>Alleldiskriminierungs-<br/>darstellung</b> | Anzeige von Daten, die bei der Post-PCR-Messung erfasst wurden. Der sog. Allelic Discrimination Plot ist eine grafische Darstellung des normalisierten Reportersignals der Sonde für Allel 1 im Vergleich zum normalisierten Reportersignal der Sonde für Allel 2.   |
| <b>Amplifikation</b>                          | Teil des Gerätelaufs, während dessen die PCR zur Amplifikation der Zielsequenz erfolgt. Für Quantifizierungsanalysen werden die während der Amplifikation gemessenen Fluoreszenzdaten in einem sog. Amplifikation Plot dargestellt und zur Berechnung von Ergebnissen verwendet. Wenn im StepOne™-System für eine Genotypisierungs- oder Positiv/Negativ-Analyse eine Amplifikation durchgeführt wird, werden die während der Amplifikation gemessenen Fluoreszenzdaten in einem Amplifikationsbildschirm dargestellt und können zur Fehlerbehebung verwendet werden.  |
| <b>Amplifikations-<br/>darstellung</b>        | Anzeige von Daten, die während der Zyklusphase der PCR-Amplifikation erfasst wurden. Diese können wie folgt angezeigt werden: <ul style="list-style-type: none"><li>• Grundlinienkorrigiertes normalisiertes Reportersignal (<math>\Delta R_n</math>) über dem Zyklus</li><li>• Normalisierter Reporter (<math>R_n</math>) über dem Zyklus</li><li>• Schwellenwert-Zyklus (<math>C_T</math>) über dem Well</li></ul>   |
| <b>Amplifikations-<br/>effizienz (EFF%)</b>   | Berechnete Effizienz der PCR-Amplifikation. Die Amplifikationseffizienz wird mithilfe der Steigung der Regressionsgeraden in der Standardkurve berechnet. Eine Steigung von etwa $-3,3$ bedeutet eine optimale, 100%ige PCR-Amplifikations-effizienz. Faktoren, die die Amplifikationseffizienz beeinflussen, sind: <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Bereich der Standardkonzentrationen</b> - Um eine korrekte und genaue Effizienzbestimmung durchzuführen, verwenden Sie einen breiten Bereich von Standardkonzentrationen 5 bis 6 Log-Stufen (<math>10^5</math> bis <math>10^6</math> fach).</li><li>• <b>Anzahl der Standardreplikate</b> - Um eine präzise Effizienzbestimmung durchzuführen, führen Sie Replikate durch, um die Auswirkungen von Pipettierfehlern zu reduzieren.</li><li>• <b>PCR-Inhibitoren</b> - PCR-Inhibitoren in der Reaktion können die Amplifikationseffizienz herabsetzen.</li></ul> |

|   |   |
|---|---|
| <b>Amplikon</b>                               | Ein mittels PCR amplifiziertes DNA-Segment.   |
| <b>Analyse</b>                                | <p>Bezieht sich auf den gesamten Prozess der Durchführung eines Laufs mithilfe des StepOne™-Systems, einschließlich Einrichtung, Lauf und Auswertung.</p> <p>Analysentypen, die Sie mit dem StepOne™-System durchführen können, sind:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Quantifizierung – Standardkurve</li><li>• Quantifizierung – relative Standardkurve</li><li>• Quantifizierung – vergleichender <math>C_T</math> (<math>\Delta\Delta C_T</math>)</li><li>• Schmelzkurve</li><li>• Genotypisierung</li><li>• Positiv/Negativ</li></ul> |
| <b>Analysedesign-Assistent</b>                | Funktion in der StepOne™-Software, die Ihnen bei der Einrichtung der Analyse entsprechend Ihrem Analysedesign hilft, indem Sie durch bewährte Schritte geführt werden.  |
| <b>Analysename</b>                            | Dieser Name wird während der Analyseeinrichtung eingegeben und dient der Identifizierung der Analyse. Analysenamen dürfen nicht länger als 100 Zeichen sein und keine der folgenden Zeichen enthalten: Schrägstrich (/), umgekehrter Schrägstrich (\), Größer-als-Zeichen (>), Kleiner-als-Zeichen (<), Stern (*), Fragezeichen (?), Anführungszeichen ("), vertikale Linie ( ), Doppelpunkt (:), oder Semikolon (;).   |
| <b>Analysetyp</b>                             | <p>Analysentypen, die Sie mit dem StepOne™-System durchführen können, sind:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Standardkurve</li><li>• Vergleichende <math>C_T</math> (<math>\Delta\Delta C_T</math>)</li><li>• Relative Standardkurve</li><li>• Schmelzkurve (nicht verfügbar im Analysedesign-Assistenten)</li><li>• Genotypisierung</li><li>• Positiv/Negativ</li></ul> <p>Der von Ihnen ausgewählte Analysetyp spiegelt sich in den Bildschirmen Setup, Run und Analysis (Einrichtung, Lauf und Analyse) wieder.</p>                     |
| <b>Assay</b>                                  | Im StepOne-System™ eine PCR-Reaktion, die Primer zur Amplifikation einer Zielsequenz und ein Reagenz zur Detektion amplifizierter Zielsequenzen enthält.  |
| <b>Assay ID</b>                               | Eine Größe, die TaqMan®-Genexpressions- und TaqMan®-SNP-Genotypisierungs-Assays von Applied Biosystems zugewiesen wird.   |
| <b>Assay-<br/>Informationsdatei<br/>(AIF)</b> | Datei auf der CD, die bei jedem Assay mitgeliefert wird. Der Dateiname enthält die Nummer des Strichcodes auf der Platte. Die Informationen im AIF werden in einem tabulatorgetrennten Format bereitgestellt.   |
| <b>Assay-Mix</b>                              | PCR-Reaktionskomponente in TaqMan®-Genexpressions-Assays und TaqMan®-SNP-Genotypisierungs-Assays von Applied Biosystems, die aus Primern zur Amplifikation einer Zielsequenz und einer TaqMan®-Sonde zur Detektion der Amplifikation der Zielsequenz besteht.   |

|   |   |
|---|---|
| <b>Assays auf Bestellung</b>            | TaqMan <sup>®</sup> -Genomassays, die zum Zeitpunkt des jeweiligen Auftrags hergestellt werden. Nur Assays, die die Anforderungen der Produktionsqualitätskontrolle erfüllen, werden ausgeliefert.  |
| <b>Aufgabe (Task)</b>                   | <p>Reaktionstyp, der in einem Well für die Zielsequenz oder den SNP-Assay durchgeführt wird. Mögliche Aufgaben in Versuchen mit dem StepOne<sup>™</sup>-System sind:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unbekannt</li> <li>• Negativkontrolle</li> <li>• Standard (Standardkurven- und relative Standardkurven-Analysen)</li> <li>• Positivkontrolle (Genotypisierungsanalysen)</li> <li>• IPC (Positiv/Negativ-Analysen)</li> <li>• Blockierte IPC (Positiv/Negativ-Analysen)</li> </ul> |
| <b>Ausgangsmenge</b>                    | Entspricht bei der Definition einer Standardkurve oder Standardverdünnungsreihe der größten oder geringsten Menge.  |
| <b>Ausreißer</b>                        | Ein Datenpunkt in einem bestimmten Datensatz, der signifikant kleiner oder größer als die anderen ausfällt.   |
| <b>AutoΔ</b>                            | <p>Einstellung zur Erhöhung oder Reduzierung der Temperatur und/oder Zeit mit jedem darauffolgenden Zyklus in einer Zyklusphase. Wenn AutoΔ aktiviert ist, werden die Einstellungen durch ein Symbol im Thermoprofil angezeigt:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• AutoΔ ein: ▲</li> <li>• AutoΔ aus: ▲</li> </ul>  |
| <b>Automatische Grundlinie</b>          | Analyseeinstellung, bei der die Grundlinien Start- und Endwerte für den Amplifikation Plot (Amplifikationsdarstellung) von der Software berechnet werden. Die Software verwendet Grundlinie und Schwellenwert zur Berechnung des Schwellenwert-Zyklus ( $C_T$ ).  |
| <b>Automatischer <math>C_T</math></b>   | Analyseeinstellung, bei der Schwellenwert und Grundlinie in der Darstellung der Amplifikation von der Software automatisch berechnet werden. Die Software verwendet Schwellenwert und Grundlinie zur Berechnung des Schwellenwert-Zyklus ( $C_T$ ).   |
| <b>Blockierte IPC</b>                   | In Positiv/Negativ-Analysen die Aufgabe, die der IPC-Zielsequenz in Wells zugewiesen wird, welche IPC-Inhibitoren statt des Proben-Templates enthalten. Siehe auch unter Negativkontrolle mit blockierter IPC.  |
| <b>Chemie</b>                           | Siehe unter Reagenzien.   |
| <b>Computergesteuerte Konfiguration</b> | Eine Systemkonfiguration, bei der das StepOne <sup>™</sup> -System durch das gelbe StepOne <sup>™</sup> -Systemkabel mit einem angeschlossenen Computer direkt verbunden ist. Bei dieser Konfiguration wird das StepOne <sup>™</sup> -System durch die StepOne <sup>™</sup> -Software auf dem angeschlossenen Computer gesteuert.   |
| <b><math>C_T</math></b>                 | Abkürzung für Schwellenwert-Zyklus.   |

|   |  |
|---|--|
| <b>Datenerfassung</b>                     | <p>Ein Prozess während des Gerätelaufs, bei dem eine Gerätekomponente von jedem Well der Reaktionsplatte Fluoreszenzdaten erfasst. Das Gerät wandelt das Signal in elektronische Daten um, und diese werden in der Analysedatei gespeichert. Ein Datenerfassungspunkt wird durch ein Symbol im Thermoprofil angezeigt:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Datenerfassung ein: </li><li>• Datenerfassung aus: </li></ul> |
| <b>Delta Rn (<math>\Delta R_n</math>)</b> | Abkürzung für grundlinienkorrigiertes normalisiertes Reportersignal.   |
| <b>Dissoziationskurve</b>                 | Siehe unter Schmelzkurve.  |
| <b>EFF%</b>                               | Siehe unter Amplifikationseffizienz (EFF%).  |
| <b>Eigenständige Konfiguration</b>        | Eine Systemkonfiguration, bei der das StepOne™-System <i>nicht</i> durch das gelbe StepOne™-Systemkabel mit einem Computer verbunden ist. Stattdessen wird ein USB-Laufwerk (  ) verwendet, um die Daten zwischen den StepOne™-Systemkomponenten zu übertragen. Bei dieser Konfiguration wird das StepOne™-System durch den Touchscreen des Geräts gesteuert.   |
| <b>Endogene Kontrolle</b>                 | Zielsequenz, die in allen analysierten Proben auf demselben Niveau vorhanden sein sollte. Wird in relativen Standardkurven- und vergleichenden $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ )-Analysen zur Normalisierung des Fluoreszenzsignals für die zu quantifizierende Zielsequenz verwendet. Wird auch als Haushaltsgen bezeichnet.   |
| <b>Endpunktanalyse</b>                    | Analyse, bei der die bei einer Post-PCR-Messung erfassten Fluoreszenzdaten zur Berechnung von Ergebnissen für Genotypisierungs- oder Positiv/Negativ-Analysen verwendet werden.  |
| <b>Endpunktmessung</b>                    | Siehe unter Post-PCR-Messung.  |
| <b>Farbstoffe von Fremdanbietern</b>      | <p>Nicht von Applied Biosystems hergestellte Farbstoffe. Sie können zur Durchführung von Real-Time PCR-Analysen auf dem StepOne™-System Farbstoffe von Fremdanbietern verwenden. Bevor Sie diese verwenden, führen Sie eine Kalibrierung der jeweiligen Farbstoffe durch.</p> <p><b>WICHTIG!</b> Applied Biosystems empfiehlt nicht die Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem™-System.</p>  |
| <b>Fernüberwachung</b>                    | Funktion in der Software, die es Ihnen erlaubt, den Status eines vernetzten Gerätes anzusehen, Analysen an das Gerät zu schicken und abgeschlossene Analysen auf Ihren Computer herunterzuladen.   |
| <b>Forward Primer</b>                     | Oligonukleotid, das an das 5'-Ende der Zielsequenz bindet. Der Reverse Primer und der Forward Primer werden zusammen in PCR-Reaktionen eingesetzt, um die Zielsequenz zu amplifizieren.  |
| <b>Grundlinie</b>                         | In der Darstellung der Amplifikation eine an die Fluoreszenz angepasste Linie für eine bestimmte Reihe von Zyklen. Wenn Sie die manuelle Grundlinienanalyseeinstellung verwenden, empfiehlt Applied Biosystems, dass Sie frühe PCR-Zyklen für die Festlegung der Grundlinie wählen.  |

|   |   |
|---|---|
| <b>Grundlinien-korrigierter normalisierter Reporter (<math>\Delta R_n</math>)</b> | Die Intensität des vom Reporter während der PCR-Amplifikation generierten normalisierten Fluoreszenzsignals.<br>$\Delta R_n = R_n$ (Endpunkt) – $R_n$ (Grundlinie), dabei ist $R_n$ = normalisierter Reporter.  |
| <b>Haltephase</b>   | Phase im Thermoprofil, die eine oder mehrere Schritte umfasst. Zum Beispiel können Sie eine Haltephase zum Thermoprofil hinzufügen, um Enzyme zu aktivieren bzw. zu deaktivieren oder um eine Reaktion zu inkubieren.   |
| <b>Haushaltsgen</b>   | Siehe unter Endogene Kontrolle.   |
| <b>Heiz-/Kühlgeschwindigkeit</b>  | Geschwindigkeit, mit der die Temperaturrampe während des Geräteslaufs erscheint. Mögliche Heiz-/Kühlgeschwindigkeiten sind Fast (schnell) und Standard.   |
| <b>Interne Positivkontrolle (IPC)</b>   | In Positiv/Negativ-Analysen ein kurzes synthetisches DNA-Template, das zu PCR-Reaktionen hinzugegeben wird. Die IPC kann dazu verwendet werden, zwischen richtig negativen Ergebnissen und Reaktionen, die durch PCR-Inhibitoren, eine fehlerhafte Assay-Einrichtung oder einen Reagenzien- bzw. Gerätefehler beeinflusst wurden, zu unterscheiden.   |
| <b>Inventarisierte Assays</b>   | TaqMan <sup>®</sup> -Genomassays, die hergestellt wurden, die Anforderungen der Qualitätskontrolle bestanden haben und in ein Bestandsverzeichnis aufgenommen wurden.   |
| <b>IPC</b>  | Abkürzung für Interne Positivkontrolle. In Positiv/Negativ-Analysen auch die Aufgabe für die IPC-Zielsequenz in Wells, die ein IPC-Template enthalten.  |
| <b>IPC+</b>   | Positiv/Negativ-Bestimmung, wenn die interne Positivkontrolle (IPC) erfolgreich ist.  |
| <b>IPC-Inhibitor</b>  | Reagenz, das zu PCR-Reaktionen hinzugegeben wird, um die Amplifikation der internen Positivkontrolle zu unterdrücken.   |
| <b>IPC-Wells mit Negativkontrolle</b>   | In Positiv/Negativ-Analysen Wells, die ein IPC-Template und einen Puffer oder Wasser statt des Proben-Templates in der PCR-Reaktion enthalten. In IPC-Wells mit Negativkontrolle sollte nur das IPC-Template amplifizieren, da die Reaktion kein Proben-Template enthält, siehe auch unter IPC+.  |
| <b>Kalibrator</b>   | Siehe unter Referenzprobe.  |
| <b>Konzentration der verdünnten Probe (10X für Reaktionsmix)</b>                  | Softwarefeld, das unter dem Reiter Sample Dilution Calculations (Berechnung der Probenverdünnung) des Bildschirms Reaction Setup (Einrichten des Pipettierprotokolls) angezeigt wird. Geben Sie für dieses Feld die Probenkonzentration ein, die Sie bei allen Proben in einer Analyse zum Reaktionsmix hinzugeben möchten. „10X for Reaction Mix“ gibt an, dass die Software annimmt, dass die Proben- oder Standardkomponente des Reaktionsmix mit einer 10fachen Konzentration vorliegt. Bei einer Konzentration der verdünnten Probe von 50,0 ng/μl (10X) beträgt die Endkonzentration der Probe in der Reaktion beispielsweise 5 ng/μl (1X). |

|  |   |
|--|---|
| <b>Laufprofil</b>  | Definition des Reaktionsvolumens und des Thermoprofils für den Geräteauf.   |
| <b>Manuelle Grundlinie</b>   | Analyseeinstellung, bei der die Grundlinien-Start- und Endwerte für die Amplifikationsdarstellung von der Software berechnet werden. Die Software verwendet Grundlinie und Schwellenwert zur Berechnung der $C_T$ -Werte.   |
| <b>Manueller <math>C_T</math></b>                                    | Analyseeinstellung, bei der Sie den Schwellenwert eingeben und auswählen, ob Sie die automatische oder manuelle Grundlinienberechnung verwenden möchten. Die Software verwendet den von Ihnen eingegebenen Schwellenwert und die Grundlinie zur Berechnung des Schwellenwert-Zyklus ( $C_T$ ).  |
| <b>Menge</b>   | Die Zielsequenzmenge in den Proben bei Quantifizierungsanalysen. Absolute Mengen können sich auf Kopienzahl, Masse, Molarität oder Virusbelastung beziehen. Relative Mengen beziehen sich auf das Vielfache, um das sich die normalisierte Zielsequenzmenge in der Probe und die normalisierte Zielsequenzmenge in der Referenzprobe unterscheiden.   |
| <b>Multikomponenten-darstellung</b>                                  | Anzeige von Daten, die während der Zyklusphase der Real-time PCR erfasst wurden. Die Multikomponentendarstellung zeigt die Fluoreszenz für alle Zyklen in einem Lauf.   |
| <b>Negativkontrolle (NC)</b>   | In Versuchen mit dem StepOne™-System die Aufgabe, die IPC-Zielsequenzen oder SNP-Assays in Wells zugewiesen ist, welche Wasser oder einen Puffer statt des Proben-Templates enthalten. In Wells mit Negativkontrolle sollte keine Amplifikation der Zielsequenz erfolgen.   |
| <b>Negativkontrolle mit blockierter IPC</b>                          | In Positiv/Negativ-Analysen Wells, die IPC-Inhibitoren statt des Proben-Templates in der PCR-Reaktion enthalten. In den durch die Negativkontrolle blockierten IPC-Wells sollte keine Amplifikation erfolgen, da die Reaktion kein Proben-Template enthält und die Amplifikation der IPC unterdrückt wird. Wird auch No Amplification Control (NAC) genannt.  |
| <b>Nicht-fluoreszierender Quencher Minor Groove Binder (NFQ-MGB)</b> | Moleküle, die an das 3'-Ende der TaqMan®-Sonden gebunden sind. Bei intakten Sonden unterdrückt der nicht-fluoreszierende Quencher (NFQ) die Abgabe eines Fluoreszenzsignals durch den Reporterfarbstoff. Da der NFQ nicht fluoresziert, erzeugt er schwächere Hintergrundsignale, und dies führt zu größerer Präzision in der Quantifizierung. Der Minor Groove Binder (MGB) erhöht die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) ohne Zunahme der Sondenlänge. Er erlaubt auch die Realisierung kürzerer Sonden. |
| <b>No Amplification Control (NAC)</b>                                | Siehe unter Negativkontrolle mit blockierter IPC.   |
| <b>No Template Control (NTC)</b>                                     | Siehe Negativkontrolle (NC).  |
| <b>Normalisierte Menge</b>   | Menge einer Zielsequenz dividiert durch die Menge der endogenen Kontrolle.  |
| <b>Normalisierter Reporter (Rn)</b>                                  | Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffs normalisiert auf das Fluoreszenzsignal der passiven Referenz.  |

---

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>Passive Referenz</b>  | <p>Farbstoff, der ein Fluoreszenzsignal erzeugt. Da das Signal der passiven Referenz in allen Wells konsistent sein sollte, wird es verwendet, um das Reporterfarbstoff-Signal zu normalisieren und Fluoreszenzschwankungen auszugleichen, die durch geringe Konzentrations- oder Volumenunterschiede zwischen den Wells entstanden sind.</p> <p>Das Normalisieren auf das Signal der passiven Referenz ermöglicht eine hohe Datengenauigkeit.</p>   |
| <b>Phase</b>             | <p>Komponente des Thermoprofils. Eine Phase besteht aus einem oder mehreren Schritten.</p>   |
| <b>Plattenbelegung</b>   | <p>Abbildung der 6 × 8-Gitterstruktur der Vertiefungen (Wells) und des ihnen zugewiesenen Inhalts in der Reaktionsplatte. In der Software können Sie die Plattenbelegung als Auswahlinstrument verwenden, um den Wells bestimmte Inhalte zuzuordnen, Well-Zuordnungen sowie um die Ergebnisse anzusehen. Die Plattenbelegung wird auf folgenden Bildschirmen angezeigt: Analysedesign-Assistent, Setup für Fortgeschrittene, Lauf und Analyse. Die Plattenbelegung kann ausgedruckt, in einen Bericht übernommen, exportiert und als Folie für eine Präsentation gespeichert werden.</p> |
| <b>Positivkontrolle</b>  | <p>In Genotypisierungsanalysen die Aufgabe für den SNP-Assay in Wells, die ein Proben-Template mit einem bekannten Genotyp enthalten.</p>  |
| <b>Post-PCR-Messung</b>  | <p>Teil des Gerätelaufs in Genotypisierungs- und Positiv/Negativ-Analysen, der nach der Amplifikation stattfindet. In Genotypisierungsanalysen werden die während der Post-PCR-Messung erfassten Fluoreszenzdaten im sog. Allelic Discrimination Plot (Alleldiskriminierungsdarstellung) dargestellt und zur Allelbestimmung verwendet.</p> <p>In Positiv/Negativ-Analysen werden die während der Post-PCR-Messung erfassten Fluoreszenzdaten im Positiv/Negativ-Plot dargestellt und zur Detektion verwendet. Wird auch als Endpunktmessung bezeichnet.</p>                             |
| <b>Prä-PCR-Messung</b>   | <p>Teil des Gerätelaufs in Genotypisierungs- und Positiv/Negativ-Analysen, der vor der Amplifikation stattfindet. Fluoreszenzdaten, die bei der Prä-PCR-Messung erfasst wurden, werden zur Normalisierung der Fluoreszenzdaten der Post-PCR-Messung verwendet.</p>   |
| <b>Primer/Sonden-Mix</b> | <p>PCR-Reaktionskomponente, die aus Primern zur Amplifikation der Zielsequenz und einer TaqMan<sup>®</sup>-Sonde zur Detektion der Amplifikation der Zielsequenz besteht.</p>  |
| <b>Primer-Mix</b>        | <p>PCR-Reaktionskomponente, die den Forward Primer und Reverse Primer zur Amplifikation der Zielsequenz enthält.</p>   |
| <b>Probe</b>             | <p>Das Template, das Sie untersuchen.</p>  |

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>Probe oder Standard (10×)</b>  | Reaktionskomponente, die unter dem Reiter Reaction Mix Calculations (Berechnung des Reaktionsmix) des Bildschirms Reaction Setup (Pipettierprotokoll) angezeigt wird. Die Software nimmt an, dass die zum Reaktionsmix hinzugefügte Probe bzw. der Standard in einer 10fachen Konzentration vorliegt. Wenn das Reaktionsvolumen zum Beispiel 20 µl beträgt, beläuft sich das berechnete Proben- bzw. Standardvolumen für 1 Reaktion auf 2 µl.   |
| <b>Probe/SNP-Assay-Reaktion</b>   | Kombination von Probe und SNP-Assay in einer PCR-Reaktion. Jede PCR-Reaktion kann nur eine Probe und einen SNP-Assay enthalten.   |
| <b>Probe/Zielsequenz-Reaktion</b> | Kombination von Probe und Zielsequenz in einer PCR-Reaktion. Im Analysedesign-Assistenten kann jede PCR-Reaktion nur eine Probe und eine Zielsequenz enthalten.   |
| <b>Probenbibliothek</b>           | Sammlung von Proben in der StepOne™-Software. Die Probenbibliothek enthält die Probenbezeichnung und die Probenfarbe.   |
| <b>Proben-DNA (10×)</b>           | Reaktionskomponente, die auf dem Pipettierprotokollbildschirm angezeigt wird. Die Software nimmt an, dass die zum Reaktionsmix hinzugefügte Proben-DNA in einer 10fachen Konzentration vorliegt. Wenn das Reaktionsvolumen zum Beispiel 20 µl beträgt, beläuft sich das berechnete Probenvolumen für 1 Reaktion auf 2 µl.   |
| <b>Punkt</b>                      | Ein Standard in einer Standardkurve. Die Standardmenge für jeden Punkt in der Standardkurve wird auf der Grundlage der Ausgangsmenge und des Verdünnungsfaktors berechnet.  |
| <b>Quantifizierungsmethode</b>    | Die in Quantifizierungsanalysen verwendete Methode zur Bestimmung der Zielsequenzmenge in den Proben. Für Quantifizierungsanalysen sind drei verschiedene Quantifizierungsmethoden verfügbar: Standardkurve, vergleichender $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ ) und relative Standardkurve.  |
| <b>Quencher</b>                   | Molekül, das an das 3'-Ende der TaqMan®-Sonden gebunden ist, um zu verhindern, dass der Reporter ein Fluoreszenzsignal abgibt, solange die Sonde intakt ist. Bei TaqMan®-Reagenzien kann der nicht fluoreszierende Quencher Minor Groove Binder (NFQ-MGB) als Quencher verwendet werden. Bei SYBR Green-Reagenzien wird kein Quencher eingesetzt.<br><b>WICHTIG!</b> Applied Biosystems empfiehlt nicht die Verwendung von TAMRA™-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem StepOne™-System. |
| <b>QuickStart</b>                 | Funktion im StepOne™-System, die es Ihnen erlaubt, die Analyse ohne die Eingabe von Platteneinrichtungsinformationen vorzunehmen.   |
| <b>R<sup>2</sup>-Wert</b>         | Regressionskoeffizient, berechnet aus der Regressionsgeraden in der Standardkurve. Der R <sup>2</sup> -Wert gibt den Grad der Übereinstimmung zwischen der Regressionsgeraden der Standardkurve und den individuellen $C_T$ -Datenpunkten der Standardreaktionen an. Ein Wert von 1,00 gibt eine perfekte Übereinstimmung zwischen der Regressionsgeraden und den Datenpunkten an.  |

---

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>Rampe</b>                    | <p>Die Rate, mit der sich die Temperatur während des Gerätelaufs ändert. Mit Ausnahme des Schmelzkurven-Schritts wird die Rampe als Prozentsatz definiert. Beim Schmelzkurven-Schritt hingegen wird die Rampe als Temperaturanstieg definiert.</p> <p>In der grafischen Darstellung des Thermoprofils wird die Rampe durch eine diagonale Linie angezeigt.</p>  |
| <b>Räumliche Kalibrierung</b>   | <p>Ein Kalibrierungstyp des StepOne™-Systems, bei dem das System die Positionen der Wells im Heizblock abbildet. Räumliche Kalibrierungsdaten dienen der Software zur Verknüpfung von Anstiegen der Fluoreszenz während eines Laufs mit spezifischen Wells auf der Reaktionsplatte.</p>   |
| <b>Reagenzien</b>               | <p>Die PCR-Reaktionskomponenten, die Sie zur Amplifikation der Zielsequenz und zur Detektion der Amplifikation verwenden. Arten von Reagenzien, die auf dem StepOne™-System verwendet werden:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• TaqMan®-Reagenzien</li><li>• SYBR® Green-Reagenzien</li><li>• Andere Reagenzien</li></ul>   |
| <b>Reaktionsmix</b>             | <p>Lösung, die alle Komponenten für eine PCR-Reaktion enthält mit Ausnahme des Templates (Probe, Standard oder Kontrolle).</p>  |
| <b>Real-Time PCR</b>            | <p>Prozess zur Erfassung von Fluoreszenzdaten während der PCR-Amplifikation. Real-Time PCR-Daten werden zur Berechnung von Ergebnissen für Quantifizierungsanalysen oder zur Fehlerbehebung bei Genotypisierungs- oder Positiv/Negativ-Analysen verwendet.</p>  |
| <b>Referenzprobe</b>            | <p>In relativen Standardkurven- und vergleichenden <math>C_T</math> (<math>\Delta\Delta C_T</math>)-Analysen die Probe, die als Ausgangsbasis für relative Quantifizierungen verwendet wird. Wird auch als Kalibrator bezeichnet.</p>   |
| <b>refSNP ID</b>                | <p>Zahl, die die Referenz-SNP(refSNP)-Cluster-ID-Nummer bezeichnet. Wird durch die Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation (SNP-Datenbank der Variationen in Nukleotidsequenzen) generiert, Sie dient unter anderem dazu, in den Lagerbeständen von Applied Biosystems nach einem SNP-Genotypisierungs-Assay von Applied Biosystems zu suchen. Wird auch als rs-Nummer bezeichnet.</p> |
| <b>Regressionsgerade</b>        | <p>In Standardkurven- und relativen Standardkurven-Analysen die Gerade bester Übereinstimmung aus der Standardkurve. Formel für die Regressionsgerade:</p> $C_T = m [\log (Qty)] + b$ <p>wobei m die Steigung, b der y-Achsenabschnitt und Qty die Standardmenge ist.</p> <p>Siehe auch unter Regressionskoeffizienten.</p>   |
| <b>Regressionskoeffizienten</b> | <p>Aus der Regressionsgeraden in Standardkurven berechnete Werte, dazu gehört der <math>R^2</math>-Wert, die Steigung und der y-Achsenabschnitt. Sie können die Werte der Regressionskoeffizienten zur Bewertung der Qualität der Ergebnisse aus den Standards benutzen, siehe auch unter Standardkurve.</p>  |

|  |   |
|--|---|
| <b>Reihe</b>                             | Siehe unter Standardverdünnungsreihe.   |
| <b>Reine Farbe</b>                       | Reagenz, das den Fluoreszenzfarbstoff enthält. Farbstoffe werden zur Durchführung einer Kalibrierung auf dem StepOne™-System verwendet, siehe auch unter Systemfarbstoff.   |
| <b>Relative Standardkurven-Methode</b>   | Quantifizierungsmethode für Quantifizierungsanalysen. Bei der relativen Standardkurven-Methode werden Ergebnisse von Standards, einer Referenzprobe und einer endogenen Kontrolle zur Bestimmung der relativen Menge einer Zielsequenz in einer Probe verwendet.  |
| <b>Replikate</b>                         | Gesamtzahl identischer Reaktionen mit identischen Komponenten und identischen Volumina.   |
| <b>Replikat-Gruppe</b>                   | Ein Satz identischer Reaktionen in einer Analyse.   |
| <b>Reporter</b>                          | Fluoreszierender Farbstoff, der zur Detektion der Amplifikation verwendet wird. Wenn Sie TaqMan®-Reagenzien verwenden, ist der Reporterfarbstoff an das 5'-Ende gebunden. Wenn Sie SYBR® Green-Reagenzien verwenden, ist der Reporterfarbstoff SYBR® Green-Farbstoff.   |
| <b>Reporter-Derivat (–Rn')</b>           | Angezeigt in der y-Achse der Schmelzkurve. Das Reporterderivat-Signal ist das negative erste Derivat der normalisierten Fluoreszenz des Reporters.  |
| <b>Reverse Primer</b>                    | Oligonukleotid, das an das 3'-Ende der Zielsequenz bindet. Der Reverse Primer und der Forward Primer werden zusammen in PCR-Reaktionen eingesetzt, um die Zielsequenz zu amplifizieren.   |
| <b>Reverse Transkriptase</b>             | PCR-Reaktionskomponente, die RNA in cDNA umwandelt. Reverse Transkriptase wird zur PCR-Reaktion hinzugegeben, um eine 1-Schritt-RT-PCR durchzuführen.   |
| <b>Rn</b>                                | Abkürzung für normalisierter Reporter.  |
| <b>Rohdatendarstellung</b>               | Anzeige der Fluoreszenzamplitude für die ausgewählten Wells für alle Filter. Zeigt die Fluoreszenzamplitude von allen Datenerfassungspunkten in einem Lauf an.  |
| <b>rs-Nummer</b>                         | Siehe unter refSNP ID.  |
| <b>Schmelzkurve</b>                      | Anzeige von Daten, die in der Schmelzkurvenphase erfasst wurden. Spitzenwerte in der Schmelzkurve können die Schmelztemperatur (T <sub>m</sub> ) der Zielsequenz angeben oder eine unspezifische PCR-Amplifikation identifizieren. Sie können die Schmelzkurve als normalisierten Reporter (Rn) im Vergleich zur Temperatur oder als Reporter-Derivat (–Rn') im Vergleich zur Temperatur anzeigen lassen. |
| <b>Schmelzkurvenphase</b>                | Phase im Thermoprofil mit einem Temperaturanstieg zur Generierung einer Schmelzkurve.   |
| <b>Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>)</b> | Punkt in der Schmelzkurve, an dem die Fluoreszenzniveaus ein Höchstniveau erreichen und anzeigen, dass sich die doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA auf trennt.  |

---

|  |  |
|--|--|
| <b>Schritt</b>                                 | Komponente des Thermoprofils. Ein Schritt wird durch die Temperatur, die Zeit, die Rampe und den Datenerfassungsstatus definiert. Für Zyklusphasen wird ein Schritt auch durch den $\Delta\Delta$ Status definiert.  |
| <b>Schwellenwert</b>                           | Fluoreszenzniveau über der Grundlinie und innerhalb des exponentiellen Wachstumsbereichs des Amplifikation Plot (Amplifikationsdarstellung). Der Schwellenwert kann automatisch bestimmt werden (siehe automatischer $C_T$ ) oder er kann manuell festgelegt werden (siehe manueller $C_T$ ).  |
| <b>Schwellenwert-Zyklus (<math>C_T</math>)</b> | Der PCR-Zyklus, bei dem $\Delta R_n$ den Schwellenwert in der Darstellung der Amplifikation erreicht.  |
| <b>Serienfaktor</b>                            | Numerischer Wert, der die Sequenz von Mengen in der Standardkurve definiert. Der Serienfaktor und die Ausgangsmenge werden zur Berechnung der Standardmenge für jeden Punkt in der Standardkurve verwendet. Wenn die Standardkurve beispielsweise mit einem Serienfaktor von 1:10 oder 10 definiert ist, bedeutet das eine 10fache Differenz zwischen zwei beliebigen nebeneinander liegenden Punkten in der Kurve.  |
| <b>Setup für Fortgeschrittene</b>              | Funktion in der Step One™-Software, die es Ihnen erlaubt, die Analyse entsprechend Ihrem eigenen experimentellen Design einzurichten.  |
| <b>SNP</b>                                     | Abkürzung für Einzelnukleotid-Polymorphismus. Der SNP kann in einer Basendifferenz oder Indel (Insertion/Deletion) bestehen.   |
| <b>SNP-Assay</b>                               | In Genotypisierungsanalysen eine PCR-Reaktion, die Primer zur Amplifikation des SNP und zwei Sonden zur Detektion unterschiedlicher Allele enthält.  |
| <b>SNP-Assay-Bibliothek</b>                    | Sammlung von SNP-Assays in der StepOne™-Software.  |
| <b>Sonden-Mix</b>                              | PCR-Reaktionskomponente, die eine TaqMan®-Sonde zur Detektion der Amplifikation der Zielsequenz enthält.   |
| <b>Standard</b>                                | Probe, die bekannte Mengen eines Standards enthält. Standardreaktionen werden in Quantifizierungsanalysen verwendet, um Standardkurven zu generieren. Siehe auch unter Standardkurve und Standardverdünnungsreihe.   |
| <b>Standardkurve</b>                           | In Standardkurven- und relativen Standardkurven-Analysen: <ul style="list-style-type: none"><li>• Die Kurve bester Übereinstimmung in einer Darstellung der <math>C_T</math>-Werte aus den Standardreaktionen, die gegen die Standardmengen aufgetragen werden, siehe auch Regressionsgerade.</li><li>• Ein Satz von Standards, der eine Reihe bekannter Mengen enthält. Daten der Standardkurven-Reaktionen werden zur Generierung der Standardkurve verwendet. Die Standardkurve ist durch die Anzahl der Punkte in der Reihe, die Anzahl der Standardreplikate, die Ausgangsmenge und den Verdünnungsfaktor definiert, siehe auch Standardverdünnungsreihe.</li></ul> |

|  |   |
|--|---|
| <b>Standardkurven-Methode</b>            | Quantifizierungsmethode für Quantifizierungsanalysen. Bei der Standardkurven-Methode werden Ergebnisse von Standards zur Bestimmung der absoluten Menge einer Zielsequenz in einer Probe verwendet.   |
| <b>Standardmenge</b>                     | <p>Eine bekannte Menge in der PCR-Reaktion.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Bei Standardkurven-Analysen: die bekannte Menge der Zielsequenz. Die Maßeinheiten für Standardmengen können die Masse, Kopienzahl, Virusbelastung oder sonstige Größen für die Messung der Zielsequenzmenge betreffen.</li><li>• Bei relativen Standardkurven-Analysen: eine bekannte Menge im Standard. Die Standardmenge kann sich zum Beispiel auf die Menge der cDNA oder die Menge der Stammlösung beziehen. Die Einheiten sind für relative Standardkurven-Analysen nicht relevant, da sie aus den Berechnungen herausfallen.</li></ul>   |
| <b>Standard-verdünnungsreihe</b>         | In Standardkurven- und relativen Standardkurven-Analysen ein Satz von Standards, der eine Reihe bekannter Mengen enthält. Die Standardverdünnungsreihe wird durch serielle Verdünnung von Standards hergestellt. Der Standardstamm wird zur Herstellung der ersten Verdünnungsstufe verwendet, die erste Verdünnungsstufe wird wiederum zur Herstellung der zweiten verwendet usw. Die zur Herstellung einer Standard-verdünnungsreihe notwendigen Volumina werden anhand der Anzahl der Verdünnungsstufen, der Anzahl der Standardreplikate, der Ausgangsmenge, des Verdünnungsfaktors und der Standardkonzentration in der Stammlösung definiert, siehe auch unter Standardkurve. |
| <b>Steigung</b>                          | Regressionskoeffizient, berechnet aus der Regressionsgeraden in der Standardkurve. Die Steigung gibt die Effizienz der PCR-Amplifikation für einen Assay an. Eine Steigung von $-3,3$ bedeutet eine 100%ige Amplifikationseffizienz, siehe auch unter Amplifikationseffizienz (EFF%).   |
| <b>SYBR<sup>®</sup> Green-Reagenzien</b> | PCR-Reaktionskomponenten, die aus zwei Primern zur Amplifikation der Zielsequenz und SYBR <sup>®</sup> Green-Farbstoff zur Detektion doppelsträngiger DNA bestehen.   |
| <b>Systemfarbstoff</b>                   | <p>Von Applied Biosystems hergestellte und auf dem StepOne<sup>™</sup>-System vorkalibrierte Farbstoffe. Systemfarbstoffe:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• FAM<sup>™</sup> Farbstoff</li><li>• JOE<sup>™</sup> Farbstoff</li><li>• ROX<sup>™</sup> Farbstoff</li><li>• SYBR<sup>®</sup> Green Farbstoff</li><li>• VIC<sup>®</sup> Farbstoff</li></ul> <p><b>WICHTIG!</b> Applied Biosystems empfiehlt nicht die Verwendung von TAMRA<sup>™</sup>-Farbstoff als Reporter oder Quencher mit dem <sup>™</sup>-System.</p>  |
| <b>TaqMan<sup>®</sup>-Reagenzien</b>     | PCR-Reaktionskomponenten, die aus Primern zur Amplifikation der Zielsequenz und einer TaqMan <sup>®</sup> -Sonde zur Detektion der Amplifikation der Zielsequenz bestehen.  |

|  |  |
|--|--|
| <b>Temperaturdarstellung</b>                                 | Anzeige der Temperaturen für Probe, Heizdeckel und Heizblock während des Systemlaufs.  |
| <b>Template</b>  | Nukleinsäuretyp, der zur PCR-Reaktion hinzugefügt wird. Das zu empfehlende Template hängt jeweils vom Analysentyp ab.  |
| <b>Thermoprofil</b>  | Teil des Laufprofils, der Temperatur, Zeit, Rampe und Datenerfassungspunkte für alle Schritte und Phasen des Gerätelaufs angibt.   |
| <b>T<sub>m</sub></b>   | Abkürzung für Schmelztemperatur (T <sub>m</sub> ).   |
| <b>Touchscreen</b>   | Geräteanzeige, mit der Sie durch Berührung das Gerät steuern.  |
| <b>unbekannt</b>   | In Quantifizierungsanalysen die Suche nach der Zielsequenz in Wells, die ein Proben-Template mit unbekannter Zielsequenzmenge enthalten.<br>In Genotypisierungsanalysen die Aufgabe für den SNP-Assay in Wells, die ein Proben-Template mit unbekanntem Genotyp enthalten.<br>In Positiv/Negativ-Analysen die Aufgabe für die Zielsequenz in Wells, die ein Proben-Template enthalten, in dem ein Vorhandensein der Zielsequenz nicht bekannt ist. |
| <b>Verdünnungsfaktor</b>                                     | Siehe unter Verdünnungsfaktor.   |
| <b>Verdünnungsmittel</b>                                     | Reagenz, das zur Verdünnung einer Probe oder eines Standards verwendet wird, bevor diese zur PCR-Reaktion hinzugegeben werden. Als Verdünnungsmittel kann Wasser oder ein Puffer verwendet werden.   |
| <b>Vergleichende C<sub>T</sub> (ΔΔC<sub>T</sub>)-Methode</b> | Quantifizierungsmethode für Quantifizierungsanalysen. Bei der vergleichenden C <sub>T</sub> (ΔΔC <sub>T</sub> )-Methode werden Ergebnisse von einer Referenzprobe und einer endogenen Kontrolle zur Bestimmung der relativen Menge einer Zielsequenz in einer Probe verwendet.   |
| <b>Well auslassen</b>  | Maßnahme, die Sie nach der Analyse durchführen, um einen oder mehrere Wells aus der Gesamtanalyse auszuschließen, bevor Sie die Daten erneut analysieren.  |
| <b>Well verwerfen</b>  | Maßnahme, die während der Analyse von der Software durchgeführt wird, um einen oder mehrere Wells aus der weiteren Analyse auszuschließen, wenn einem Well eine bestimmte Markierung zugewiesen wird.  |
| <b>y-Achsenabschnitt</b>                                     | Regressionskoeffizient, berechnet aus der Regressionsgeraden in der Standardkurve. Der y-Achsenabschnitt gibt den erwarteten Schwellenwert-Zyklus (C <sub>T</sub> ) für eine Probe mit einer Menge gleich 1 an (z. B. 1 ng/μl).  |
| <b>Zielsequenz</b>   | Die Nukleinsäuresequenz, die Sie amplifizieren und bestimmen möchten.  |
| <b>Zielsequenzbibliothek</b>                                 | Sammlung von Zielsequenzen in der StepOne™-Software.   |
| <b>Zielsequenzfarbe</b>                                      | Einer Zielsequenz zugeordnete Farbe, um diese in den Plattenbelegungs- und Analyse-Darstellungen zu identifizieren.  |

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>Zyklusphase</b>          | Phase im Thermoprofil, die wiederholt wird. Wenn die Zyklusphase zur Durchführung einer PCR verwendet wird, nennt man sie Amplifikationsphase. |
| <b>Zyklus-Schwellenwert</b> | Siehe unter Schwellenwert-Zyklus ( $C_T$ ).  |

# Stichwortverzeichnis

## Numerische Einträge

- 1-Schritt-RT-PCR
  - Informationen 3-8
  - RNA-Quantifizierung 3-27
  - Verwendete Primer 3-9
- 2-Schritt-RT-PCR
  - Informationen 3-8
  - RNA-Quantifizierung 3-27
  - Verwendete Primer 3-9

## A

- Amplikon-Positionen
  - 3'-Primer-Ende 3-24
  - 5'-Sondenende 3-24
  - Auswahl 3-23
  - G/C-Gehalt 3-24
  - Schmelztemperatur 3-24
  - Screening 3-23
- Amplikons, kleine auswählen 3-24
- Analysedesign einrichten
  - Quantifizierung 3-22
- Andere fluoreszenzmarkierte Reagenzien 1-6
- Arbeitsablauf des Analysedesign-Assistenten 1-6, 1-7, 1-8
- Assay-Typ Custom (Kundenspezifisch) 1-8, 1-9
  - Positiv/Negativ-Analysen 5-15
  - Quantifizierungsanalysen 3-22
- Assay-Typ Inventorized/Inventarisiert 1-7
- Assay-Typ Made to Order (Auf Bestellung) 1-7
- Assay-Typen
  - Assays Inventarisiert/Auf Bestellung 1-7
  - Auswahl 1-7
  - Custom Assays 1-8, 1-9
  - Genotypisierungsanalysen 4-6
  - Positiv/Negativ-Analysen 5-5
  - Quantifizierungsanalysen 3-13
  - Vorentworfene/validierte Assays 1-8

## C

- Carryover, UNG zur Vermeidung 2-7
- Custom TaqMan Gene Expression Assays 3-20, 5-12
- Custom TaqMan SNP Genotyping Assays 4-14

## D

- Datenerfassung 1-2
- DNA-/cDNA-Quantifizierung, Thermocycling-Bedingungen 3-28

## E

- Endogene Kontrolle 3-6
- Endpunktanalysen
  - Genotypisierung 4-4
  - Positiv/negativ 5-4
- Experimentelles Design
  - Genotypisierung 4-13, 4-16
  - Positiv/negativ 5-15

## F

- Farbstoffbindung, Methoden 2-4
- Fehlerhafte Übereinstimmung bei Genotypisierungsanalysen 4-5

## G

- G/C-Gehalt und Amplikon-Positionen 3-24
- Genotypisierungsanalysen
  - Assay-Typen 4-6
  - Auswahl des Master-Mixes 4-13, 4-16 beschrieben 4-4
  - Design 4-13, 4-16
  - Fehlerhafte Übereinstimmung 4-5
  - Funktionsweise 4-4
  - Geräte 4-4
  - Komponenten 4-4
  - Schlussfolgerungen für Assay Design Guidelines C-2
  - TaqMan-Reagenzien 2-2

## H

- Haarnadelschleifen und Primer-Auswahl 3-9

## I

- IPC 5-4, 5-5

## K

- Kleine Amplikons, auswählen 3-24
- Kontamination, Minimierung, DNA 2-7

**M**

- Master-Mix
  - Auswahl für Genotypisierungsanalysen 4-13, 4-16
  - Auswahl für Positiv/Negativ-Analysen 5-14
  - Auswählen für Quantifizierungsanalysen 3-21
- Multiplex-PCR
  - beschrieben 3-10
  - Primer-Limitierung 3-11
  - rRNA-Primer B-1
  - Singleplex-Vergleich 3-11
- MultiScribe Reverse Transcriptase, Definition 3-28

**N**

- Negativkontrollen 3-5, 3-6, 4-4, 5-4

**O**

- Optimierung 3-34

**P**

- PCR, allgemeine Praktiken 2-8
- Positiv/Negativ-Analysen
  - Assay-Typen 5-5
  - Auswahl des Master-Mixes 5-14
  - definiert 5-4
  - Design 5-15
  - Durchführung ohne IPC 5-4
  - Funktionsweise 5-5
  - Komponenten 5-4
  - Reagenzien für Assay-Typ Custom auswählen 3-26
  - Richtlinien zum Design des Assay-Typs Custom (kundenspezifisch) 5-15
  - TaqMan-Reagenzien 2-2
  - Verwendung einer IPC 5-5
- Positivkontrollen 4-4
- Primer
  - 1-Schritt-RT-PCR 3-9
  - 2-Schritt-RT-PCR 3-9
  - Haarnadelschleifen 3-9
  - Standardkonzentrationen 3-31
  - Zusammenfassung der Design-Hinweise 3-25
- Primer Express-Software
  - Kleine Amplikons 3-24
  - Positiv/Negativ-Analysen 5-15
  - Quantifizierungsanalysen 3-22
  - SNP-Assays 1-9
- Primer-Limitierung, Multiplex-Assays 3-11
- Primer-Matrix
  - Beispiellimitierung B-2
  - Limitierungen definieren B-2
  - Verwendung 3-31
- Probe 3-5, 3-6, 4-4, 5-4

**Q**

- Quantifizierungsanalysen
  - Assay-Typen 3-13
  - Auswahl des Master-Mixes 3-21
  - Auswahl einer Quantifizierungsmethode 3-5
  - Design 3-22
  - erklärt 3-4
  - Hinweise zum Design eines kundenspezifischen Assay-Typs 3-22
  - Reagenzien für Assay-Typ Custom auswählen 3-26
  - Reagenzientyp auswählen 3-13
  - Real-Time PCR 3-4
  - Relative Standardkurve 3-5
  - Schlussfolgerungen für Assay Design Guidelines C-1
  - Standardkurve 3-5
  - SYBR Green-Reagenzien 2-4, 3-33
  - TaqMan Reagenzien 2-2
  - Vergleichen 3-7
  - Vergleichende CT 3-6

**R**

- Reagenzien
  - Andere fluoreszenzmarkierte 1-6
  - Auswahl 1-6, 2-5
  - Für kundenspezifischen Assay-Typ auswählen 3-26
  - SYBR Green-Reagenzien 1-6
  - TaqMan-Reagenzien 1-6, 2-2
  - Voraussetzungen 2-6
- Real-Time PCR
  - Quantifizierungsanalysen 3-4
  - TaqMan-Detektionsprozess 2-2
- Referenzprobe 3-5, 3-6
- Relative Standardkurven-Analysen
  - Informationen 3-5
  - Komponenten 3-5
  - Siehe auch Quantifizierungsanalysen 3-5
- Replikate 3-5, 3-6, 4-4, 5-4
- Richtlinien zum Assay-Design
  - Auswahl der Reagenzien 3-26
  - Genotypisierungsanalysen C-2
  - Informationen C-1
  - Positiv/Negativ-Analysen 5-15
  - Primer und Sonde 3-23, 3-25
  - Primerkonzentrationen optimieren 3-31
  - Quantifizierungsanalysen 3-22, C-1
  - Sondenkonzentration optimieren 3-34
  - Thermocycling-Bedingungen 3-28
- RNA-Quantifizierung
  - 1-Schritt-RT-PCR 3-27
  - 2-Schritt-RT-PCR 3-27
  - Thermocycling-Bedingungen 3-29
- RT-PCR
  - 1-Schritt- 3-8
  - 2-Schritt- 3-8
  - Methodenvergleich 3-7, 3-10

**S**

- Schmelztemperatur und Amplikon-Positionen 3-24
- Setup für Fortgeschrittene 1-6, 1-7, 1-8
- Sonden
  - Sondenkonzentration optimieren 3-34
  - verfügbare TaqMan-MGB-Sonden 2-4
  - Zusammenfassung der Design-Hinweise 3-25
- Standardkurven-Analysen
  - Informationen 3-5
  - Komponenten 3-5
  - Siehe auch Quantifizierungsanalysen 3-5
- Standards 3-5
- Standardverdünnungsreihe 3-5
- StepOne-System
  - Analysetypen 1-5
  - Assay-Typen 1-7
  - Datenerfassung 1-2
  - Reagenzientypen 1-6
  - Verbrauchsmaterialien 1-3
- SYBR Green-Reagenzien
  - Entwicklung 2-4
  - Funktionsweise 2-5
  - Quantifizierungsanalysen optimieren 3-33
  - Zu beachten bei der Auswahl 2-6

**T**

- TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays 4-11
- TaqMan Endogenous Control Assays 3-19
- TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents 5-13
- TaqMan Gene Expression Assays 3-18, 5-10
- TaqMan PDARs for AD 4-12
- TaqMan SNP Genotyping Assays 4-10
- TaqMan-MGB-Sonden 2-3
- TaqMan-Reagenzien
  - Analysetypen 2-2
  - Entwicklung 2-2
  - Funktionsweise 2-2
  - Zu beachten bei der Auswahl 2-6
- Thermocycling-Bedingungen
  - 1-Schritt-RT-PCR 3-29
  - 2-Schritt-RT-PCR 3-29
  - DNA-/cDNA-Quantifizierung 3-28
  - RNA-Quantifizierung 3-29

**U**

- UNG, Carryover vermeiden 2-7
- Universal Master Mix-Reagenzien
  - Vorteile der Polymerase 3-27
- unspezifisches Produkt, Kontamination mit Farbstoff
  - SYBR Green 2-7

**V**

- Verbrauchsmaterialien, unterstützte 1-3
- Vergleichende CT-Analysen
  - Informationen 3-6
  - Komponenten 3-6
  - Siehe auch Quantifizierungsanalysen 3-6
- Vorentworfene/validierte Assay-Typen 1-8





#### **Worldwide Sales and Support**

Applied Biosystems vast distribution and service network, composed of highly trained support and applications personnel, reaches 150 countries on six continents. For sales office locations and technical support, please call our local office or refer to our Web site at [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com).

Applied Biosystems is committed to providing the world's leading technology and information for life scientists.

#### **Headquarters**

850 Lincoln Centre Drive  
Foster City, CA 94404 USA  
Phone: +1 650.638.5800  
Toll Free (In North America): +1 800.345.5224  
Fax: +1 650.638.5884

06/2010