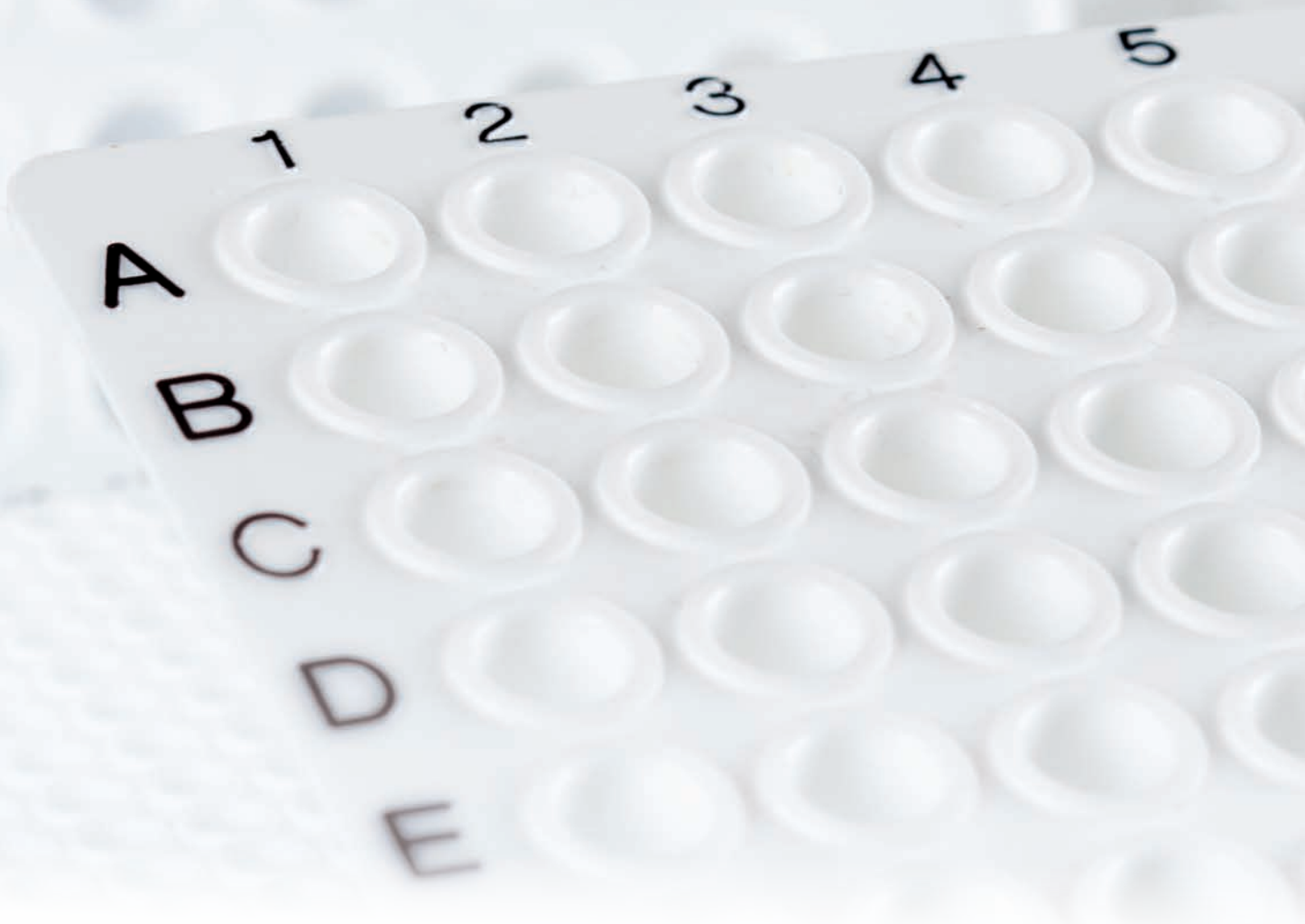


Tipp des Monats

Präzisere Real-Time PCRs mit
weißen PCR-Gefäßen

Verbesserte Reproduzierbarkeit – Optimierte Sensitivität – Crosstalk vermeiden



Präzisere Real-Time PCRs mit weißen PCR-Gefäßen

Fluoreszenzbasierte Anwendungen, wie die Real-Time PCR (qPCR) profitieren insbesondere bei der Verwendung kleiner Volumina von den signifikant besseren Reflektionseigenschaften weißer PCR-Verbrauchsmaterialien. Dennoch werden heutzutage bei der Durchführung von qPCRs oft immer noch transparente Verbrauchsmaterialien eingesetzt. Erfahren Sie hier wie Sie ganz einfach Ihre qPCRs verbessern können.

Wie wird durch die Verwendung weißer PCR-Gefäße die Reproduzierbarkeit beeinflusst?

Durch die maximale Fluoreszenz-Reflektion weißer Gefäße geht einerseits kein Fluoreszenzlicht durch die Wandung der Wells verloren und andererseits ist die Fluoreszenzlichtmenge, die den Detektor erreicht, konstanter als beim Einsatz von transparenten Produkten. So erzielen Sie eine geringere Streuung bei der Detektion von Duplikaten oder Triplikaten sowie bei der Wiederholung von Experimenten.



Transparente und weiße PCR-Platte im Vergleich

Wieso kann ein verbessertes Signal/Hintergrund Verhältnis erreicht werden?

Aufgrund des vielfach höheren Fluoreszenzniveaus von weißen PCR-Verbrauchsmaterialien und dem gleichbleibenden Hintergrundeffekten durch das verwendete Fluorophor, wird bei der Detektion in weißen PCR-Gefäßen ein verbessertes Signal / Hintergrund Verhältnis erzielt.

Kann der „Crosstalk“ zwischen den einzelnen Wells vermieden werden?

Bei der Verwendung von transparenten Wells kann es durch die Streuung des Fluoreszenzlichtes zur Detektion der Fluoreszenz in benachbarten Wells kommen. Durch die vollständige und lichtundurchlässige Einfärbung von weißen PCR-Verbrauchsmaterialien können die Fluoreszenz-Detektoren des Thermocyclers keine Fluoreszenzsignale der benachbarten Wells mehr detektieren.

Wie verändert sich durch die Verwendung weißer PCR-Gefäße die Sensitivität der PCR?

Diese Frage möchten wir anhand eines vergleichenden qPCR-Experimentes darstellen. Das in Abb.1 dargestellte Versuchsergebnis veranschaulicht zunächst, dass die gemessene Fluoreszenzintensität bei gleicher Template-Menge, in weißen Gefäßen deutlich höher ausfällt, als in transparenten Gefäßen. Für die klaren und für die weißen PCR-Ketten in Abb.1 wurde der Threshold unabhängig voneinander automatisch vom Thermocycler errechnet. Zur Detektion der 1.000 Template-Moleküle in den transparenten Gefäßen wurde ein mittlerer C_q-Wert (n = 8) von $24,87 \pm 0,08$ und für die weißen Gefäße ein C_q-Wert von $23,40 \pm 0,07$ errechnet. Das bedeutet, in weißen Gefäßen erfolgt die Detektion früher. Dies ist insbesondere ein Vorteil, wenn nur geringe Probenmengen zur Verfügung stehen. So kann durch den Einsatz von weißen Verbrauchsmaterialien noch eine erfolgreiche Detektion erzielt werden, wenn mit transparenten Verbrauchsmaterialien kein sinnvoller PCR-Lauf mehr möglich ist.

Vergleich des Fluoreszenzniveaus von weißen und transparenten Wells

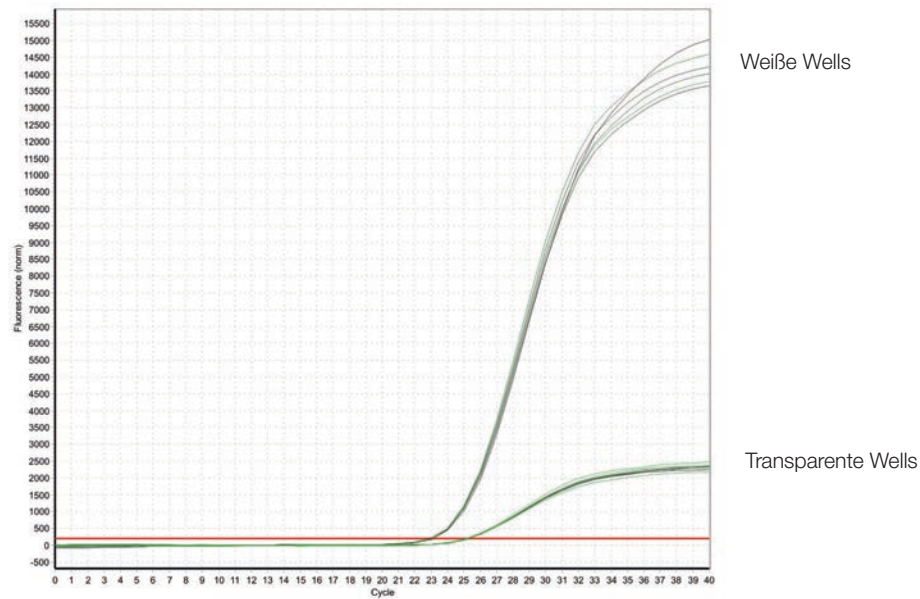


Abb.1 Vergleichender PCR-Lauf der PCR-Kette 72.985.002 (transparent) und 72.985.092 (weiß) jeweils verschlossen mit der hochtransparenten Deckelkette 65.989.002. Amplifiziert wurde ein 100 bp Fragment des EmGFP-Plasmids (Template-Menge 1.000 Moleküle) in einem Volumen von 20 µl mit dem Eppendorf realplex 4S Thermocycler (n = 8).

Wie wird eine ökonomische Volumenreduktion der Versuchsansätze möglich?

Da mit weißen PCR-Verbrauchsmaterialien ein vielfach höheres Fluoreszenzniveau erzielt wird, kann das Volumen der Versuchsansätze und damit die Mengen der verwendeten Reagenzien (Enzym, Sonde, Primer, etc.) deutlich reduziert werden. So können Reagenzien-Kosten eingespart werden.

Fazit: Der Einsatz von weißen PCR-Verbrauchsmaterialien bringt beachtliche Vorteile, die Sie nicht ignorieren sollten. Kompromittieren Sie nicht Ihre Ergebnisse nur damit eine optische Überprüfung der Wells von der Seite oder unten möglich ist!

