

Durchführung der PCR / PCR Programm

Die Genaxxon Polycarbonatkapillaren haben einen etwas größeren Durchmesser verglichen mit den 20 µl Glaskapillaren von Roche.

Um trotz des größeren Durchmessers einen effektiven Temperaturübergang von der Außenseite der Kapillare bis zum Mittelpunkt der PCR Reaktion zu gewährleisten, kann es angeraten sein die "Hold-Zeiten" beim Denaturierungs- und Annealingschritt zu verlängern.

Aus diesem Grund empfehlen wir die Zeiten für die Denaturierung und für das Annealing auf mindestens 7 (10) Sekunden zu setzen. Zu kurze Denaturierungs- und Annealingzeiten führen dazu, dass keine PCR stattfindet, oder dass zumindest der CT Wert deutlich höher liegt wird.

Sollten beide Zeiten schon von vorne herein größer als 7 Sekunden programmiert sein, so müssen keine Veränderungen im Programm vorgenommen werden. Zur Sicherheit können aber beide Schritte um zusätzlich 3-5 Sekunden verlängert werden.

Da die Denaturierungseffizienz vor allem auch vom GC-Gehalt der Probe abhängt, können sogar noch längere Denaturierungszeiten von Vorteil sein. Falls kein PCR-Signal zu erkennen ist, kann die Denaturierungszeit versuchsweise auf 15 Sekunden erhöht werden.

Beispiele

PCR-Step	Glass	Polycarb.	Glass	Polycarb.	Glass	Polycarb.
Denaturierung	0 sec.	7 sec.	5 sec	7-10 sec	>7 sec	>7 sec
Annealing	0 sec.	7 sec	5 sec	7-10 sec	>7 sec	>7 sec

Probenentnahme nach durchgeführter PCR

Manche Kunden möchten die PCR-Reaktion auch auf dem Gel analysieren. Hierfür kann man den Deckel wieder von den Polycarbonatkapillaren abnehmen (Transfer-Stift oder von Hand) und das Reaktionsgemisch mit einer 10 µl Pipettenspitze aus der Kapillare entnehmen. Manche Pipettenspitzen (Sarstedt, AHN, und andere) haben eine zu dicke Spitze. In diesem Fall kann die Polycarbonatkapillare einfach mit einer Schere zerschnitten werden. Der abgeschnittene Kapillareteil mit der PCR Reaktionslösung wird umgekehrt in ein Reaktionsgefäß gestellt und durch zentrifugieren wird das Reaktionsgemisch in das Reaktionsgefäß überführt.

Genaxxon BioScience

Polycarbonate Capillaries User Guide

Product	Cat#	Package size
Polycarbonate Capillaries for use in capillary PCR	I2250.0960	960 capillaries
Starter Kit with polycarbonate capillaries	I2250.0961	672 capillaries + 1 carousel
PEEK-Carousel for use in LightCycler machines	I2250.0001	1 carousel

Sample preparation / PCR Mixture preparation

Samples for PCR can be handled and prepared according to the existing protocol at customer site. No changes have to be made using polycarbonate capillaries instead the original glass capillaries from Hofmann La-Roche.

No changes have to be made preparing the PCR Mix.

It is possible to use our polycarbonate capillaries for PCR volumes from 10 µl to 50 µl without changes in the PCR programme (for details see point PCR programme).

Handling capillaries and caps

For better/easier handling of the capillaries and caps we provide a "Transfer-Pin" for taking the capillaries and the caps out of the rack-box. The Transfer-Pin is part of our "Starter-Kit". If you are used to work without a "Transfer-Pin", you can also work without it, but use protective gloves to protect you PCR-reaction from contamination, by for example DNAses.

For sealing the capillaries with the caps, please use the transfer pin, to transfer caps from the rack-box to the polycarbonate capillary. Ensure that each capillary is closed tightly by checking it visually (the smaller part of the caps must be completely inserted into the plastic capillary). Normally you can hear 2 times a "click", if the cap fits well.

The LightCycler Carousel(s)

Genaxxon offers 2 versions of LightCycler carousel that fit to LightCycler Versions 1.2 and 1.5 or to Version 2.0 respectively. Same with the centrifuge rotor for the LightCycler 1.2 / 1.5 or 2.0 carousel. It is not possible to use the carousels in the wrong Version of a LightCycler or to use the wrong carousel in the wrong centrifuge rotor.

Please inform Genaxxon about the LightCycler version available in your laboratory.

Performing PCR / PCR programme

Our polycarbonate capillaries have a bigger diameter, compared to the 20 µl glass capillaries from Roche.

To guarantee effective heat transfer from the outside of the capillaries to the middle of the PCR reaction, despite the bigger diameter, it might be necessary to increase the "hold-times" at Denaturing and Annealing.

For this reason we recommend strongly to program your LightCycler® with at least 7-10 seconds at 95°C for the denaturing step and 7 seconds for the annealing step. Too short denaturing and annealing times will lead to a complete failure of your PCR, or at least to much higher CT-times.

If you are already using a programme with both times higher than 7 seconds, no changes have to be made normally. Nevertheless it might be useful to increase the existing denaturing and/or annealing times by 3 to 5 seconds each.

As the easiness of denaturing DNA depends on the GC-content of your DNA, it might be better to prolong denaturing up to 15 seconds (only in case of **NO** PCR signal with a denaturing time of 10 seconds).

Example

PCR-Step	Glass	Polycarb.	Glass	Polycarb.	Glass	Polycarb.
Denaturing	0 sec.	7 sec.	5 sec	7-10 sec	>7 sec	>7 sec
Annealing	0 sec.	7 sec	5 sec	7-10 sec	>7 sec	>7 sec

Sample recovery after PCR

Some customer want to analyse the PCR reaction on a gel. For that purpose the cap can be taken from the capillary with the Transfer-Pin. The recovery of the sample is principally possible using pipettes with a 10 µl tip. In some cases the pipet tips are too broad (Sarstedt, AHN and other brands). In this case you can cut the capillaries with scissors and spin the solution into a clean reaction tube.

Genaxxon BioScience

Polycarbonatkapillaren - Anwenderinfo

Produkt	Katalog #	Packungsinhalt
Polycarbonatkapillaren für die Kapillar-PCR	I2250.0960	960 Kapillaren
Starter Kit mit Polycarbonatkapillaren	I2250.0961	672 Kapillaren + 1 Karussell
PEEK-Karussell für den Einsatz im LightCycler	I2250.0001	1 Karussell

Bereitstellung der Probe / Herstellen der PCR Mischung

Die Probe mit der DNA für die PCR kann entsprechend einem bereits bestehenden Protokoll hergestellt werden. Gegenüber Glaskapillaren von Roche sind keine zusätzlichen Abläufe oder Punkte zu beachten.

Auch der PCR-Mix kann entsprechend bestehender Protokolle angefertigt werden.

Es ist möglich die Polycarbonatkapillaren für PCR Volumina von 10 µl bis 50 µl, ohne Änderungen am PCR-Programm, einzusetzen (für Details siehe auch den Punkt „PCR Programm“).

Handhabung der Kapillaren und Deckel

Für die einfachere Handhabung stellt Genaxxon einen so genannten "Transferstift" zur Verfügung (Teil des Starterkits). Mit dem Transferstift können die Kapillaren und Deckel aus der Rack-Box entnommen werden. Falls der Kunde gewohnt ist, ohne einen Transferstift zu arbeiten können sowohl Kapillaren als auch die Deckel mit den Fingern aus der Rack-Box genommen werden. Das sollte aber mit Einmalhandschuhen geschehen, um die PCR-Probe vor Verunreinigungen mit z.B. DNAsen zu schützen.

Um die Kapillaren mit den Deckeln richtig zu verschließen, ist der Transferstift das richtige Werkzeug. Damit können die Deckel einfach aus der Rack-Box entnommen und auf die Kapillaren gesetzt werden. Zum richtigen Verschließen der Kapillaren bitte fest aufdrücken. Man kann normalerweise 2x ein „Klack“ hören, wenn der Deckel richtig eingerastet ist. Zusätzlich kann man visuell kontrollieren, ob der Deckel richtig sitzt, indem man kontrolliert, ob der schmalere Teil der Kapillare auch vollständig in der Kapillare sitzt.

Das LightCycler® Karussell

Genaxxon bietet 2 Versionen des LightCycler Karussells an. Diese passen entweder in den LightCycler 1.2/1.5 oder den LightCycler 2.0, bzw. in den zugehörigen Zentrifugenrotor für den entsprechenden LightCycler Rotor.

Bitte informieren Sie Genaxxon darüber, welche LightCycler Version bei Ihnen im Labor steht.