

Anleitung zur Durchführung einer qPCR mit dem ABI 7500Fast



Benötigtes Material:


Produktname	REF Nummer / Order No.	Ungefähre Kosten
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	4360954	20 Stk. 183.00 Fr. (Lubio).
MicroAmp® Optical Adhesive Film	4360954	25 Stk. 149.00 Fr. (Lubio)
LightCycler® 480 SYBR Green I Master ¹	04887352001	5ml ca. 200.00 Fr.
Nuclease-Free Water		
Primer (4.5 µM) ²		
Einkanalpipetten (10, 100, 1000 µl)		Spitzen über Tick-Liste
8-Kanalpipette (10 µl)		Spitzen über Tick-Liste
Stepper + 0.2 ml Spitzen		Spitzen über Tick-Liste
Zentrifuge im G62 (mit Platteneinsatz)		
1.5 ml Tubes		Tick-Liste
qPCR Protokoll	siehe nächste Seite (Pipettiervorlage) - Einstellungen zum Protokoll folgen auf den folgenden Seiten (Beispiel einer Pipettiervorlage auf letzter Seite)	

¹) über UTOX beziehen – 30% Rabatt auf Roche Produkte

²) Stock conc. = 100µM ; 4,5µM ist „working conc.“

Tpps:

- Zwingend sauber und genau pipettieren (qPCR ist sehr heikel)
- MasterMix mit Stepper verteilen
- Zuerst Proben pipettieren, dann negativ- und positiv-Kontrollen - erst am Schluss den Standard
- Standards können mit 8-Kanalpipette pipettiert werden
- Falls mehrere Male das Gleiche pipettiert werden muss, können auch die Proben auf einer Platte vorgelegt werden, sodass auch diese mit der 8-Kanal pipettiert werden können.
- Beim Aufkleben der Folie diese mit Taschentuch/Kleenex andrücken und nicht mit Handschuhen, **Folie muss sauber sein!**
- Die Verdünnungen am besten von A1 nach H1 und im Duplikat pipettieren z. B in A1 sind 10^7 Kopien/µl und in H1 wären dann 10^0 Kopien/µl. Das Duplikat wird dann gerade auf Reihe nebenan pipettiert (A2-H2) Replikate der gleichen Verdünnung sollen immer **nebeneinander** pipettiert werden z.B. A1, A2 und nicht untereinander z.B. A1, B1

	Aphids quantitative PCR		Aquatic Ecology
	Lab-Form Primer testing: Analysis		
Created by Marco Thali	created on 17.03.2016	Version 2016.01	updated : 17.03.2016

Primer testing with 2x SYBR Green I Master

Reagents	Primer names and/or	Aliquot / Lot No	Concentration	Date of preparation/dilution
SYBR Green I Master (Roche)	Product No. 04887352001		2 x	
ddH ₂ O				
Forward Primer			4.5 µM	
Reverse Primer			4.5 µM	

Sample names	Concentration	Date / Date of dilution
Sample DNA	see sample sheet file:	see sample sheet from:
	ng/µl	

Procedure:

1. Fill in name of PCR program, annealing temperature, no of PCR cycles, name of PCR machine, no of primer pairs and total no of PCR reactions below

PCR program name 2-Step	Annealing temp (°C)	Nr of cycles 50	PCR machine Cycler 11 - ABI 7500Fast
Nr of primer pairs 1	Total Nr of PCR reactions 96	Plus volume (%) 5	Total volume of SYBR mix (µl) 630.00

2. Prepare Mix by adding ddH₂O (I) and 2x SYBR Green I Master (II) in separate tube
3. Add primers (III) / (IV) and mix well
4. Distribute 10 µl of mix into PCR wells
5. Add 2.5 µl of sample DNA or positive/negative control into corresponding PCR well(s)

	Mix per primer	Mix per reaction	Final concentr.
ddH ₂ O	126.0 µl (I)	1.25 µl	
SYBR Green I Master (Roche)	630.0 µl (II)	6.25 µl	1 x
Forward Primer	126.0 µl (III)	1.25 µl	0.450 µM
Reverse Primer	126.0 µl (IV)	1.25 µl	0.450 µM
Total:	1008.0 µl	10.00 µl	
Sample DNA / controls		2.50 µl	0 ng/µl
Final volume		12.50 µl	

PCR program 2-Step:

Heated lid	105°C	
50 °C	2 min	
95 °C	10 min	
95 °C	15 sec	
0 °C	30 sec	50x

PCR program melting curve:

95 °C	15 sec	
60 °C	60 sec	
95 °C		↓ 30 min
10 °C	∞	

Sample order:

Primer Fwd													Primer Rev	Species		
A																A
B																B
C																C
D																D
E																E
F																F
G																G
H																H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				

Notes:

Project Group:	Organism(s):	Date:	Person in charge:

Standort Gerät: LA E76 rechts neben -80°C Tiefkühler

Verantwortliche: Smitha Pillai – BU-E09 (Utox) ☎ 5255

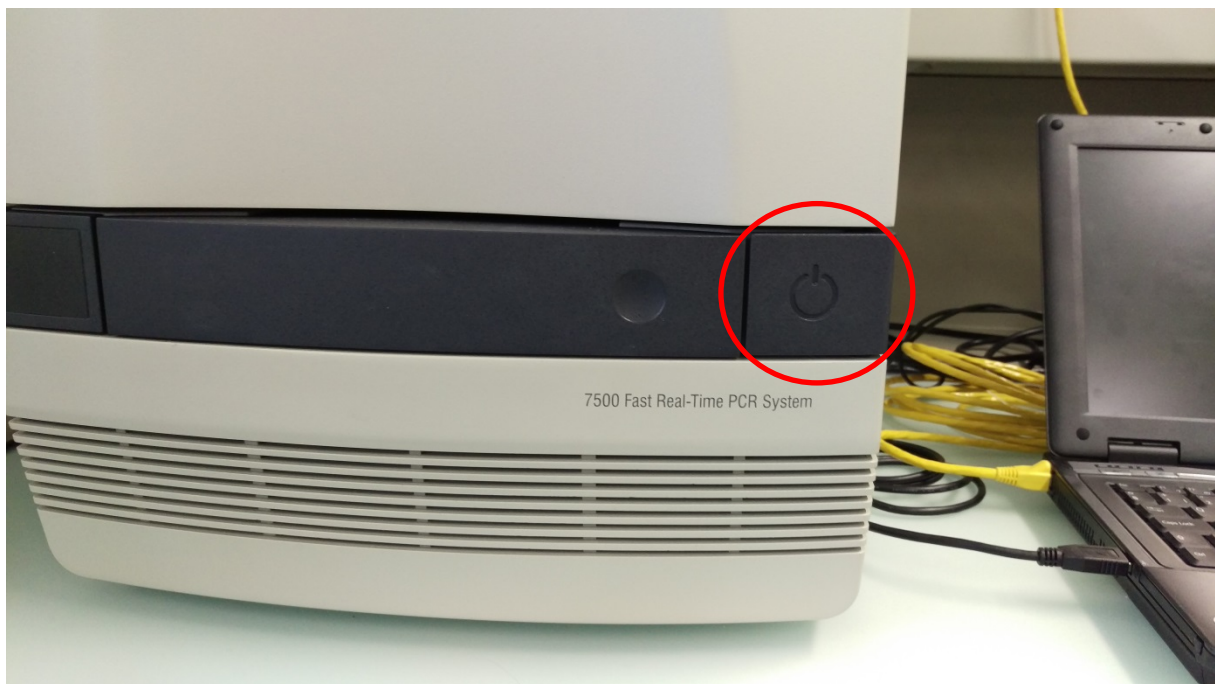
Stephan Fischer – BU-E09 (Utox) ☎ 5567

Bevor man das Gerät zum ersten Mal benützt, muss eine Einführung durch eine der verantwortlichen Personen gemacht werden!

Gerät reservieren mit Name, Zeitpunkt, Länge des Gebrauchs (Agenda liegt neben dem Laptop)



Gerät starten (am besten mindestens 30 Minuten bevor man es braucht, um aufzuwärmen)



Computer starten
Programm starten

Username: ABIQPCR (sollte schon eingetragen sein)
Passwort: ABI7500@eaw
Softwarename ist **7500 Software v2.3**



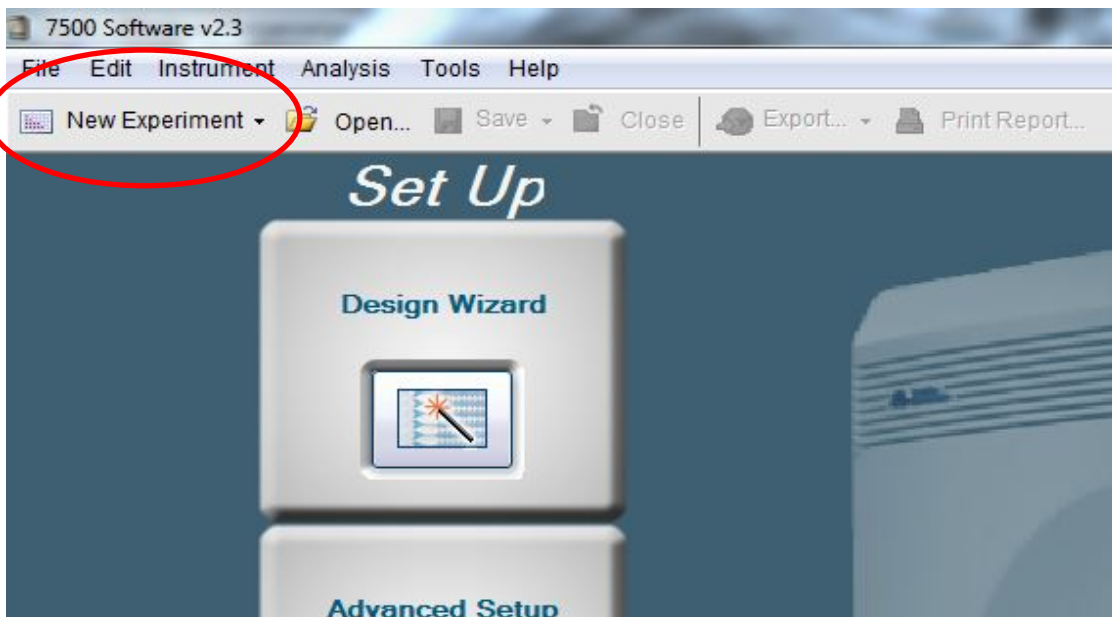
Falls Fehlermeldung kommt, dass eine Kalibration notwendig ist, an **Smitha oder Stephan** wenden.

Sonst sollte sich dieses Feld öffnen

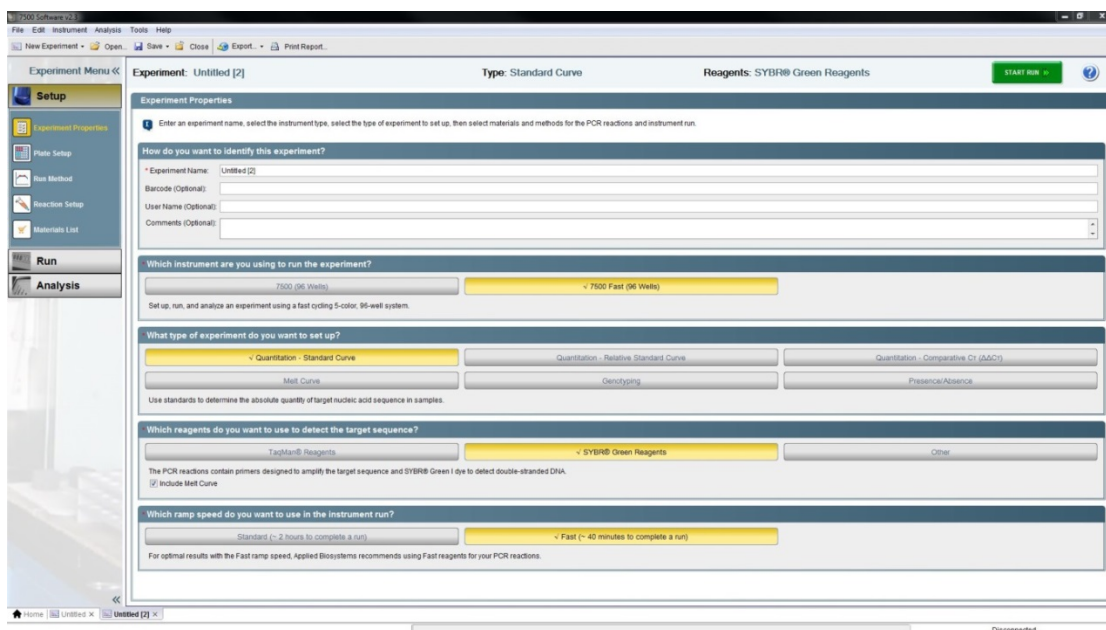


Neues Experiment starten

Feld **New Experiment** anklicken – **nicht Pfeil** andrücken



Folgendes Fenster öffnet sich



1. Experiment Name eintragen
2. Which Instrument you use: 7500 Fast (96 Wells) beim Wechsel des Instruments muss bei der Meldung Ja angeklickt werden
3. What type of Experiment: Quantitation- Standard Curve
4. Which reagents to detect: SYBR® Green Reagents
5. Which ramp speed is Instrument: Fast (~ 40 Minutes to complete a run)

Experiment Properties

1 Enter an experiment name, select the instrument type, select the type of experiment to set up, then select materials and methods for the PCR reactions and instrument run.

How do you want to identify this experiment?

Experiment Name:

Barcode (Optional):

User Name (Optional):

Comments (Optional):

Which instrument are you using to run the experiment?

7500 (96 Wells) **7500 Fast (96 Wells)**

Set up, run, and analyze an experiment using a fast cycling 5-color, 96-well system.

What type of experiment do you want to set up?

Quantitation - Standard Curve Quantitation - Relative Standard Curve Quantitation - Comparative Ct (ΔΔCt)

Melt Curve Genotyping Presence/Absence

Use standards to determine the absolute quantity of target nucleic acid sequence in samples.

Which reagents do you want to use to detect the target sequence?

TaqMan® Reagents **SYBR® Green Reagents** Other

The PCR reactions contain primers designed to amplify the target sequence and SYBR® Green I dye to detect double-stranded DNA.

Include Melt Curve

Which ramp speed do you want to use in the instrument run?

Standard (~ 2 hours to complete a run) **Fast (~ 40 minutes to complete a run)**

For optimal results with the Fast ramp speed, Applied Biosystems recommends using Fast reagents for PCR reactions.

Plate Setup auswählen (2. Element in dunkelblauer Box links im Bildschirm)



Folgendes Fenster öffnet sich

Define Targets and Samples

1 Instructions: Define the targets to quantify and the samples to test in the reaction plate.

Define Targets

Target Name	Reporter	Quencher	Colour
Target 1	SYBR	None	■

Add New Target

Für jeden zu amplifizierenden Genabschnitt muss ein neues Target erstellt werden. Dann Target Name eintragen, Reporter ist SYBR, Quencher ist None (Target 1 ist bereits automatisch eingetragen)

Define Targets and Samples Assign Targets and Samples

1 Instructions: Define the targets to quantify and the samples to test in the reaction plate.

Define Targets

Target Name	Reporter	Quencher	Colour
Target 1	SYBR	None	

Samples Definieren:

Dafür Add New Sample drücken und Namen eintragen (Dieses Feld befindet sich neben dem Feld Define Targets)

Define Samples

Sample Name	Color
Sample 1	

Hier sollten alle Proben (inkl. Standards und Kontrollen) eingetragen werden. Für jedes benutze „well“ einer Platte muss also eine Probe definiert werden.

Assign Targets and Samples anwählen:

Hier werden die einzelnen „wells“ den eben eingetragenen Proben zugeordnet

Define Targets and Samples **Assign Targets and Samples**

Instructions:
 To set up standards: Click "Define and Set Up Standards".
 To set up unknowns: Select wells, assign target(s), select "U" (Unknown) as the task for each target assignment, then assign a sample.
 To set up negative controls: Select wells, assign target(s), then select "N" (Negative Control) as the task for each target assignment.

Assign target(s) to the selected wells.

Assign	Target	Task	Quantity
<input type="checkbox"/>	Target 1	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	

Mixed Unknown Standard Negative Control

Define and Set Up Standards

Assign sample(s) to the selected wells.

Assign	Sample
<input type="checkbox"/>	Sample 1

Assign sample(s) of selected well(s) to biological group.

Assign	Biological Group
<input type="checkbox"/>	

Select the dye to use as the passive reference.
ROX

View Plate Layout View Well Table

Select Wells With: - Select Item - - Select Item -

Show in Wells View Legend

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Wells: Unknown Standard Negative Control

96 Empty

Zuerst wird die Standardkurve definiert

Dafür **Define and Set Up Standards** drücken

Assign target(s) to the selected wells.

Assign	Target	Task	Quantity
<input type="checkbox"/>	Target 1	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	

Mixed Unknown Standard Negative Control

Define and Set Up Standards

Assign sample(s) to the selected wells.

Assign	Sample
<input type="checkbox"/>	Sample 1

Folgendes Fenster öffnet sich

Select a target * = Required

* Select a target for the standards Target 1 ▼

Define the standard curve * = Required

Standard Curve Preview

* # of Points: 5 Recommended

* # of Replicates: 3 Recommended

* Starting Quantity: Enter the highest or lowest standard quantity for the standard curve.

* Serial Factor: ▼ Select a value from 1:10 to 10×

8 Points X 2 Replicates = 16 Required Wells

Select and arrange wells for the standards

Use Wells: Automatically Select Wells for Me **Let Me Select Wells**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

16 Required Wells / 16 Selected Wells

A1,A2,B1,B2,C1,C2,D1,D2,E1,E2,F1,F2,G1,G2,H1,H2

Arrange standards in: Columns Rows

Apply

Reset Fields

Close

Select Target: Jeweiligen Target auswählen

of Points: Anzahl Verdünnungen welche gemacht worden sind

of Replicates: Anzahl Replikate von jeder Verdünnung

Starting Quantity: Höchste Konzentration der Verdünnungen eintragen

Serial Factor: Verdünnungsfaktor eintragen (von 1:2 bis 1:10 möglich)

Let Me Select Wells anwählen und gewünschte Felder auswählen. Anschliessend **Apply** anwählen (Wenn Close gedrückt wird ohne zuerst Apply gedrückt zu haben, speichert es die Standardkurve nicht!)

Close drücken um Fenster zu schliessen


Danach wird die Passiv-Referenz definiert:

Dazu sicherstellen, dass bei **Select the Dye** „None“ angewählt ist! (Diese Einstellung ist unter dem Feld bei dem die Standards definiert werden)

Assign target(s) to the selected wells.

Assign	Target	Task	Quantity
<input type="checkbox"/>	Target 1	<input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	

* Mixed U Unknown S Standard N Negative Control

 Define and Set Up Standards

Assign sample(s) to the selected wells.

Assign	Sample
<input type="checkbox"/>	Sample 1

Assign sample(s) of selected well(s) to biological group.

Assign	Biological Group
--------	------------------

Select the dye to use as the passive reference.

None ▼

Danach werden alle Proben definiert:

- Proben definieren:
- Gewünschtes Feld auf Platte anklicken
 - Bei Assign das passende Target anwählen durch Kreuz setzen
 - Bei Task auswählen ob unbekannt (U) oder negative Kontrolle (N)
 - Bei Assign sample die gewünschte Probe durch Kreuz setzen auswählen

The screenshot shows two windows for assigning targets and samples to wells, and a well plate layout.

Assign target(s) to the selected wells.

Assign	Target	Task	Quantity
<input checked="" type="checkbox"/>	Target 1	<input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N	

Mixed Unknown Standard Negative Control

Define and Set Up Standards

Assign sample(s) to the selected wells.

Assign	Sample
<input checked="" type="checkbox"/>	Sample 1

View Plate Layout | **View Well Table**

Show in Wells | View Legend

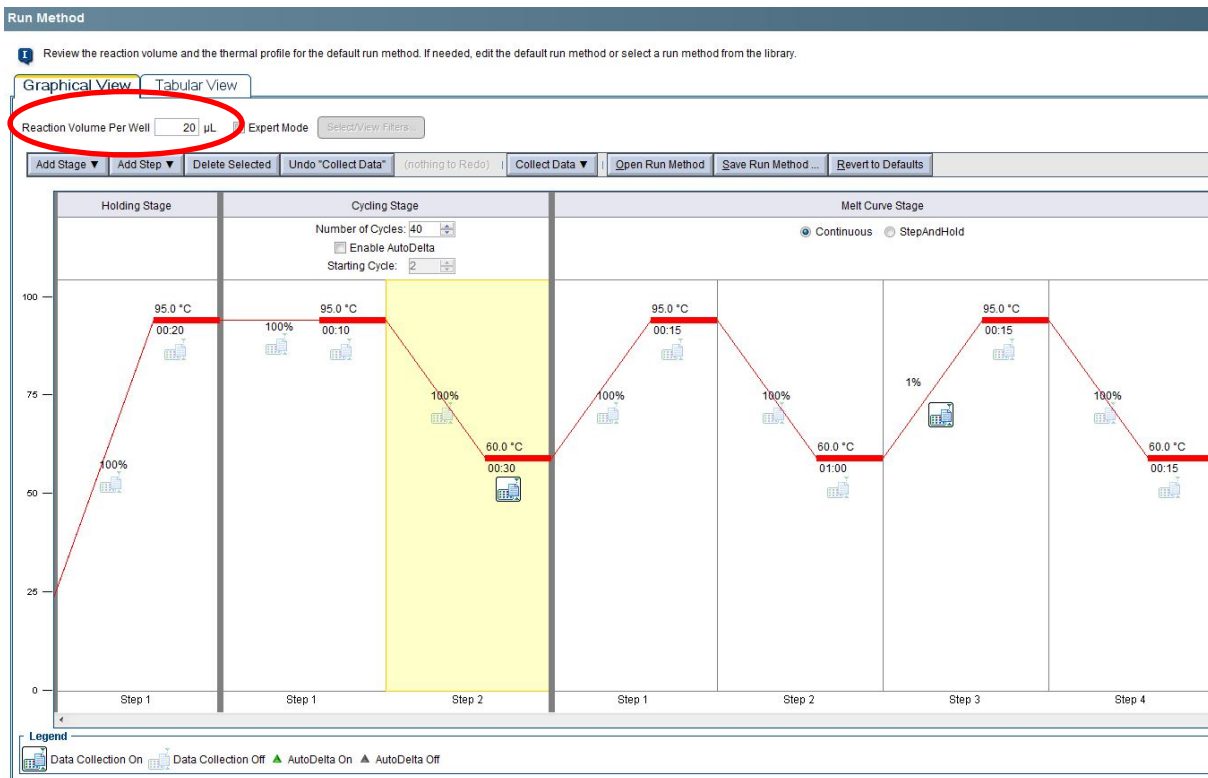
	1	2	3
A	<input checked="" type="checkbox"/> S Target 1 1E6	<input checked="" type="checkbox"/> S Target 1 1E6	<input checked="" type="checkbox"/> U Target 1 Sample 1
B	<input checked="" type="checkbox"/> S Target 1 1E5	<input checked="" type="checkbox"/> S Target 1 1E5	
C	<input checked="" type="checkbox"/> S Target 1 1E4	<input checked="" type="checkbox"/> S Target 1 1E4	
D	<input checked="" type="checkbox"/> S Target 1 1E3	<input checked="" type="checkbox"/> S Target 1 1E3	
E	<input checked="" type="checkbox"/> S Target 1 100	<input checked="" type="checkbox"/> S Target 1 100	

Run Method anwählen (3. Element in dunkelblauer Box links im Bildschirm)

Experiment Menu <<

- Setup
- Experiment Properties
- Plate Setup
- Run Method**
- Reaction Setup
- Materials List

Reaktionsvolumen eintragen



Verschiedene Phasen (Stage) und Schritte (Step) hinzufügen:


Add Stage: Hinzufügen einer neuen Phase (Holding und Cycling Stage möglich) Die Melt Curve sollte automatisch in der Run Method vorhanden sein, falls nicht dann kontrollieren ob bei „**which reagents to detect**“ **SYBR® Green** angewählt ist (Falls TaqMan® angewählt ist, ist es nicht möglich eine Schmelzkurve hinzuzufügen)

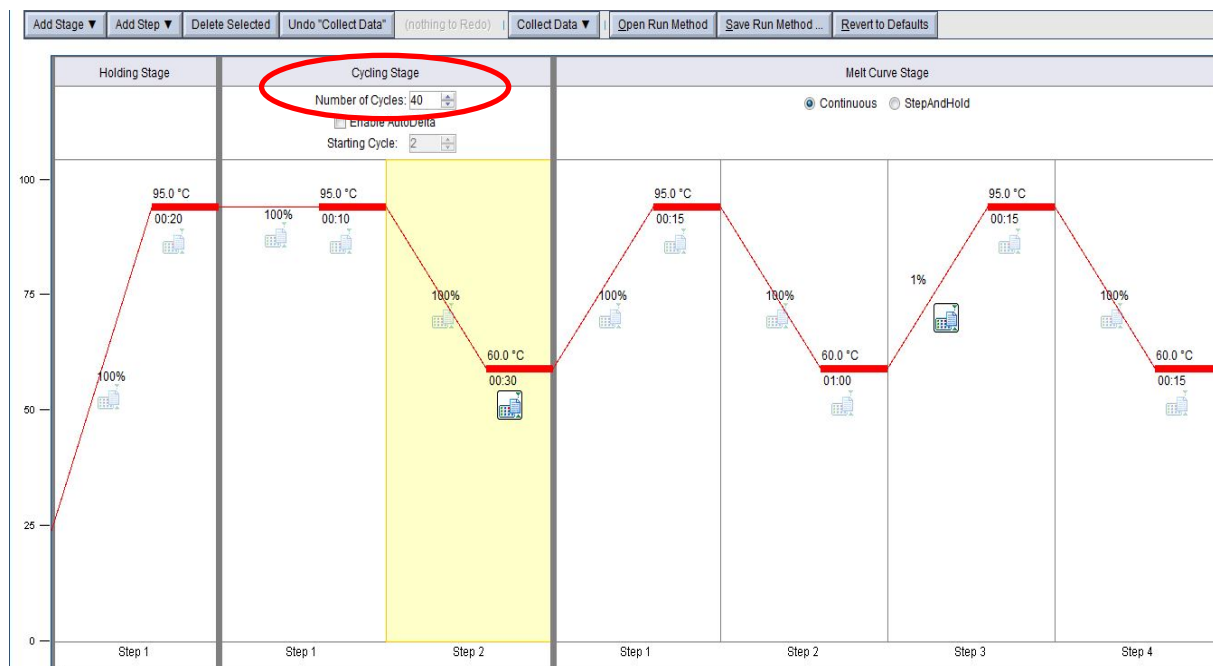
Add Step: Definieren ob der Schritt vor oder nach dem angewählten Schritt (gelb) hinzugefügt wird

Delete Selected: Gelb markierte Phase/Schritt wird gelöscht

Bei Temperatur und Zeit die gewünschten Werte eintragen

Bei Cycling Stage die Anzahl Zyklen eintragen

Das Zeichen  steht für den Messpunkt (muss bei Cycling Stage bei der Elongation und bei Melt Curve Stage beim kontinuierlichen Erhöhen der Temperatur) Falls gelbes Feld erscheint **The number of data collection points is not valid**, muss kontrolliert werden das nicht irgendwo ein falscher Messpunkt gesetzt worden ist (erkennt man dadurch ob das Messpunktzeichen nicht leicht durchsichtig ist)



Die Steigung von 1% bei der Schmelzkurve entspricht etwa 30 Minuten um von 60°C auf 95°C zu erwärmen.

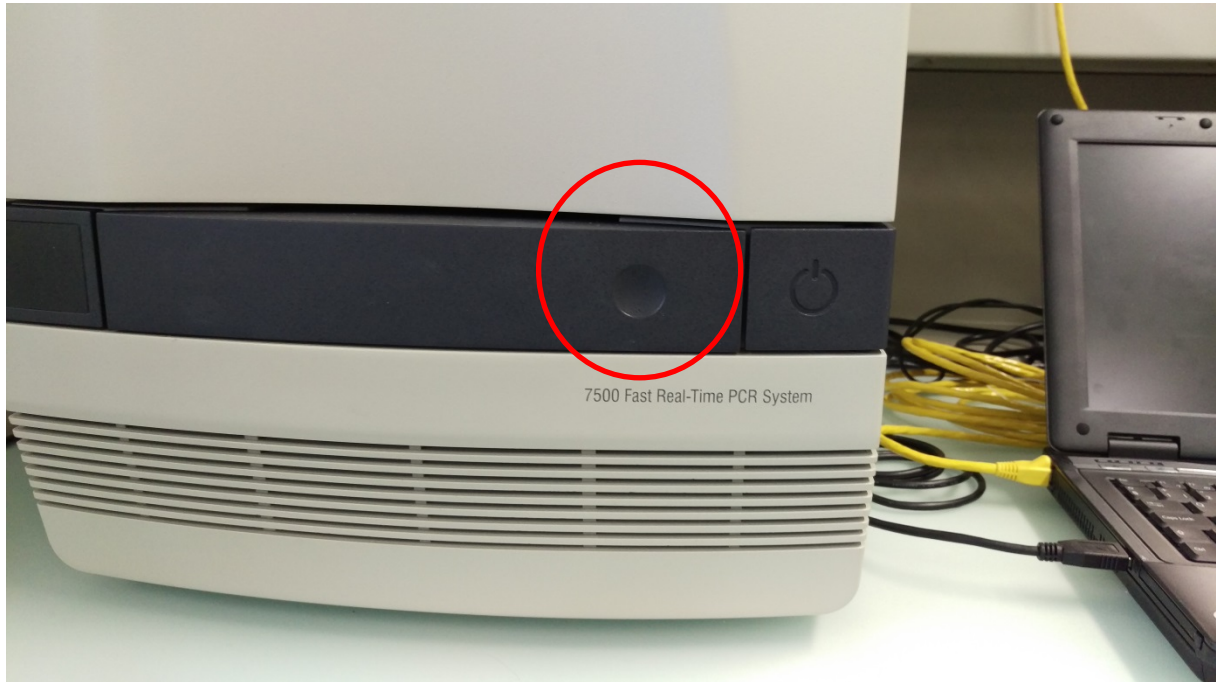
Holding Stage besteht immer aus **1 Step (halten der Temperatur)**

Cycling Stage besteht immer aus **2 Steps (denaturierung + annealing/elongation)**

Melt Curve Stage besteht immer aus **4 steps (4x Temperatur halten)**

Platte in ABI 7500Fast einlegen

Bei Einbuchtung fest drücken bis „klick“ macht und Schublade **von alleine** rausfährt



ABI Platte einlegen

Well A1 muss oben links sein!

Dann Schublade wieder zudrücken (geht streng) bis „klick“ macht



Wenn alles korrekt angegeben



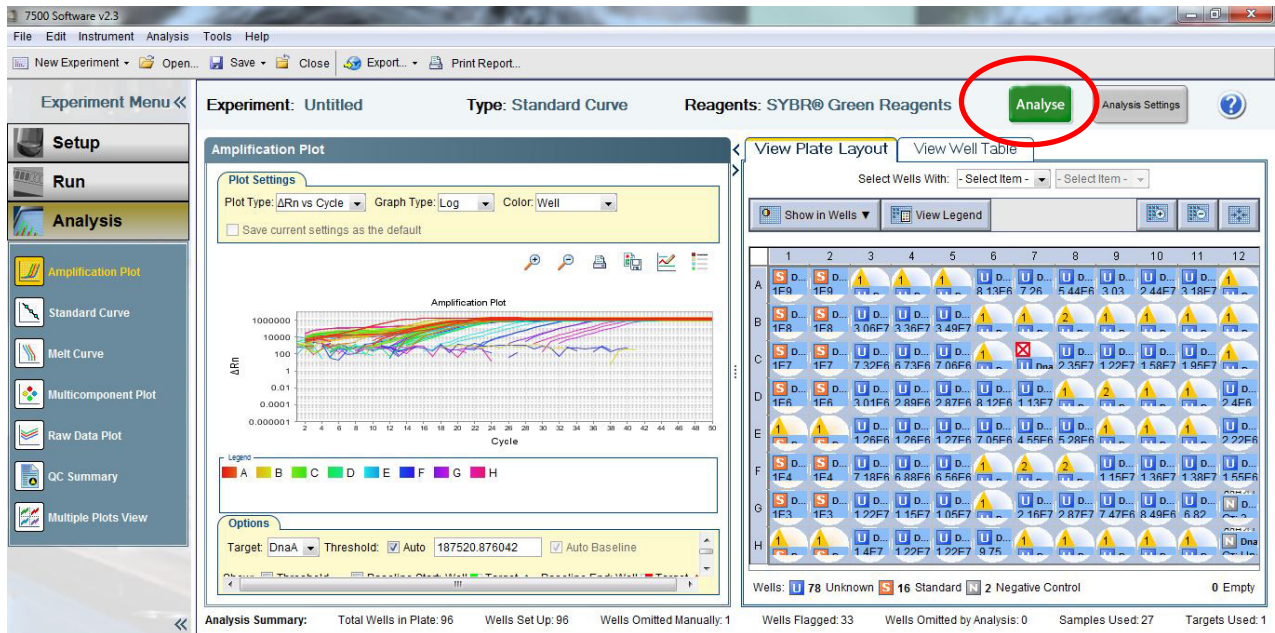
drücken

Wichtig: Beim Gerät bleiben, bis der erste oder zweite Zyklus beendet ist, da manchmal Fehlermeldungen kommen und der Lauf dann nicht gestartet wird!

Nach Beendigung des Runs

Auswertung

Um Daten zu erhalten muss grüner Knopf **Analyse** (oben rechts) gedrückt werden (nach erstmaligen drücken, steht dann **Reanalyse**)

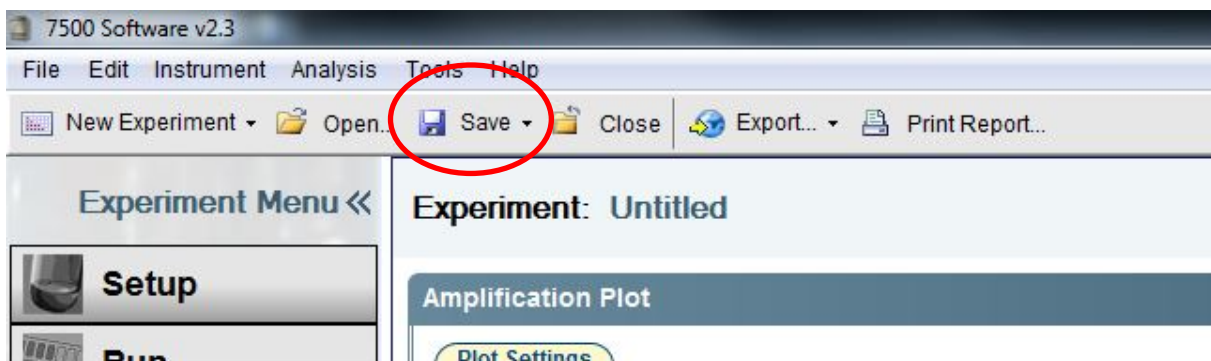


Lauf speichern:

Auf Pfeil neben Diskette drücken und Save As drücken und gewünschten Speicherort auswählen

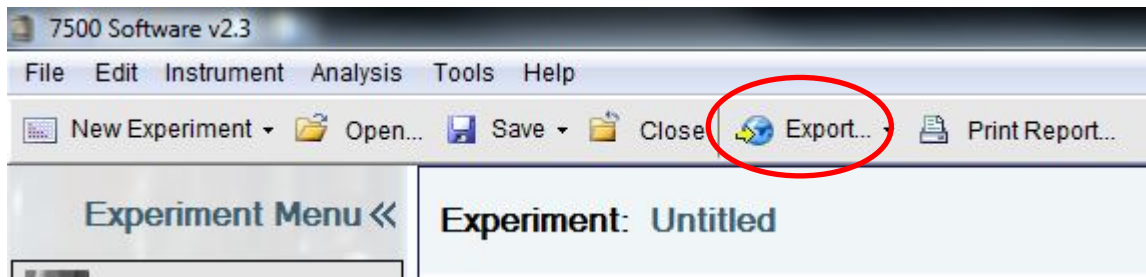
Falls gleiches Experiment mehrmals wiederholt wird kann es als Templat abgespeichert werden

(Niemals Lauf zuerst als Template abspeichern und dann Save as drücken da alle Daten dann verloren gehen!)

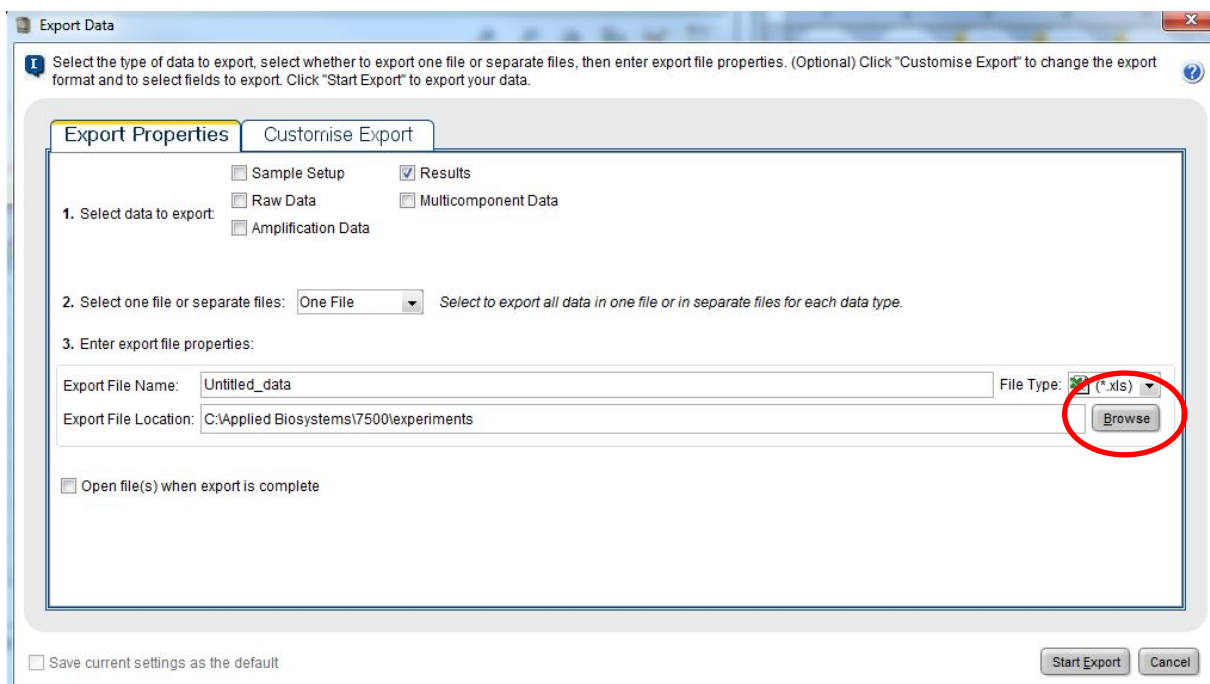


Gewonnene Daten exportieren:

Auf Export drücken



Dieses Fenster sollte sich öffnen



Bei 1. Kann ausgewählt werden welche Daten exportiert werden (wichtig ist das bei **Results** ein Häkchen ist)

Falls bei 1. mehrere Häkchen gesetzt worden sind, kann bei 2. entschieden werden, ob alle Daten in einem Excel Sheet (jedes Kreuz steht für eine Mappe) eingefügt werden oder in separaten Files.

Bei 3. Kann der File Name und Speicherort (Browse anklicken) ausgewählt werden

Danach **Start Export** drücken (unten rechts)

Nach dem Exportieren erscheint ein Feld in dem man gefragt wird ob noch mehr Daten exportiert werden sollen oder das Feld geschlossen werden soll.

Am Schluss Gerät und Laptop ausschalten (**Platte rausnehmen und entsorgen**)

Beispiel einer qPCR Pipettiervorlage

eawag aquatic research	Aphids quantitative PCR Lab-Form Primer testing: Analysis	Aquatic Ecology	
Created by Marco Thali	created on 17.03.2016	Version 2016.01	updated : 17.03.2016

Primer testing with 2x SYBR Green I Master

Reagents	Primer names and/or	Aliquot / Lot No	Concentration	Date of preparation/dilution
SYBR Green I Master (Roche)	Product No. 04887352001		2 x	
Ap_DnaA_Fwd	5'-AAT GCT TGG ATC ATA ATT TAA AGAC-3' - 2558179		4.5 µM	05.04.2016
Ap_DnaA_Rev	5'-GTTT TGG AAG AAA GAA ATG TTT CAA G-3' - 2558180		4.5 µM	05.04.2016
Ap_EF1a_Fwd	5'-TAG CAG TTA CAT CAA GAA AAT CGG-3' - 2558177		4.5 µM	05.04.2016
Ap_EF1a_Rev	5'-ATG TTG TCT CCA TTC CAT CCA G-3' - 2558178		4.5 µM	05.04.2016

Sample names	Concentration	Date / Date of dilution
Sample DNA	see sample sheet file:	see sample sheet from:
	ng/µl	05.04.2016

Procedure:

1. Fill in name of PCR program, annealing temperature, no of PCR cycles, name of PCR machine, no of primer pairs and total no of PCR reactions below

PCR program name 2-Step	Annealing temp (°C) 57	Nr of cycles 50	PCR machine Cycler 11 - ABI 7500Fast
Nr of primer pairs 1	Total Nr of PCR reactions 96	Plus volume (%) 5	Total volume of SYBR mix (µl) 630.00

2. Prepare Mix by adding ddH₂O (I) and 2x SYBR Green I Master (II) in separate tube
3. Add primers (III) / (IV) and Probe (V) and mix well
4. Distribute 10 µl of mix into PCR wells
5. Add 2.5 µl of sample DNA or positive/negative control into corresponding PCR well(s)

	Mix per primer	Mix per reaction	Final concentr.
ddH ₂ O	126.0 µl (I)	1.25 µl	
SYBR Green I Master (Roche)	630.0 µl (II)	6.25 µl	1 x
Forward Primer	126.0 µl (III)	1.25 µl	0.450 µM
Reverse Primer	126.0 µl (IV)	1.25 µl	0.450 µM
Total:	882.0 µl	10.00 µl	
Sample DNA / controls		2.50 µl	0 ng/µl
Final volume		12.50 µl	

PCR program 2-Step:

Heated lid	105°C	
50 °C	2 min	
95 °C	10 min	
95 °C	15 sec	50x
57 °C	30 sec	
PCR program mekting curve:		
95 °C	15 sec	
60 °C	60 sec	
95 °C		↓ 15 min
10 °C	∞	

Sample order:

	Primer Fwd	Standardreihe	Proben											Primer Rev	Species	
A	Ap_DnaA_Fwd	10 ⁹	10 ⁹	A15-10	A15-10	A15-10	A15-383	A15-383						Ap_DnaA_Rev	Spiroplasma	A
B		10 ⁸	10 ⁸	A15-11	A15-11	A15-11	A15-385pi	A15-385pi								B
C		10 ⁷	10 ⁷	A15-17	A15-17	A15-17	A15-392gr	A15-392gr								C
D		10 ⁶	10 ⁶	A15-27	A15-27	A15-27	OX-C161	OX-C161								D
E		10 ⁵	10 ⁵	A15-198bis	A15-198bis	A15-198bis	A15-383	ddH2O								E
F		10 ⁴	10 ⁴	A15-316	A15-316	A15-316	A15-385pi	ddH2O								F
G		10 ³	10 ³	A15-364	A15-364	A15-364	A15-392gr									G
H		10 ²	10 ²	A15-370	A15-370	A15-370	OX-C161									H
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			

Notes:

Project Group:	Organism(s): Spiroplasma sp.	Date:	Person in charge:
-----------------------	--	--------------	--------------------------