



Genaxxon Bioscience User Guide for Polycarbonate Capillaries

Manual for using the Genaxxon
polycarbonate capillaries
in Roche LightCycler® machines

Contact & Technical support

Tel.: 089 7000 9551

Fax: 089 700 88 367

e-mail: info@genaxxon.com



Genaxxon BioScience GmbH
Beim Wiesental 22
D-88400 Biberach

www.genaxxon.com

Version: 01082007

Produkt	Katalog #	Packungsinhalt
Polycarbonate Kapillaren	I2250.0960	960 Kapillaren
Starter Kit mit Polycarbonatkapillaren	I2250.0961	192 Kapillaren + 1 Karussell 1.5
Starter Kit mit Polycarbonatkapillaren	I2250.0962	192 Kapillaren + 1 Karussell 2.0
PEEK-Karussell für den LightCycler® 1.2/1.5	I2250.0001	1 Karussell 1.2/1.5
PEEK-Karussell zur Benutzung im LightCycler® 2.0	I2250.0002	1 Karussell 2.0

Product	Cat#	Package size
Polycarbonate Capillaries for use in capillary PCR	I2250.0960	960 capillaries
Starter Kit with polycarbonate capillaries	I2250.0961	192 capillaries + 1 carousel 1.5
Starter Kit with polycarbonate capillaries	I2250.0962	192 capillaries + 1 carousel 2.0
PEEK-Carousel for use in LightCycler™ 1.2/1.5	I2250.0001	1 carousel 1.2/1.5
PEEK-Carousel for use in LightCycler™ 2.0	I2250.0002	1 carousel 2.0

Hotline: +49 89 70009551 or info@genaxxon.com

Notes on Warranties and Disclaimer

Genaxxon is dedicated to your success and every batch of this product is tested with an extensive routine procedure to make sure that it meets all your needs. However, it has neither been developed nor tested for a specific application.

This product is for research use only. For *in vitro* use only

Genaxxon's liability with respect to any product is limited to the replacement of the product. No other warranties are provided by Genaxxon. Genaxxon is not liable to any direct, indirect, incidental or consequential damage arising out of or in connection with the use of any of Genaxxon products.

Beispiel (95°C Denaturierung)

	Glass	Polycarb.	Glass	Polycarb.	Glass	Polycarb.
Denaturing	0 sec.	10 sec.	5 sec	10-12 sec	> 7 sec	> 10 sec
Annealing	0 sec.	10 sec	5 sec	10-12 sec	> 7 sec	> 10 sec
Extension	10 sec.	10 sec.	5 sec	5-8 sec	> 7 sec	> 7 sec

Beispiel (97°C Denaturierung)

	Glass	Polycarb.	Glass	Polycarb.	Glass	Polycarb.
Denaturing	0 sec.	5 sec.	5 sec	7-10 sec	> 7 sec	< 10 sec
Annealing	0 sec.	10 sec	5 sec	10 sec	> 7 sec	> 10 sec
Extension	10 sec.	10 sec.	5 sec	5-8 sec	> 7 sec	> 7 sec

Fluoreszenz Detektion

Alle Standardfarbstoffe (Probes) können auch bei Benutzung der Genaxxon Kapillaren detektiert werden. Hierzu ist keine Änderungen der Einstellungen notwendig.

Falls ROX als Fluoreszenzfarbstoff detektiert werden soll, kann es zu Schwierigkeiten kommen. Bei Verwendung von ROX sollte daher eine Gelelektrophorese gefahren werden. Ist die DNA-Bande im Gel sichtbar, es ist aber nicht möglich die Fluoreszenz mit dem LightCycler® zu detektieren, so gibt es keine Möglichkeit die PCR mittels verlängerter Hold-Zeiten, oder Erhöhung der Denaturierungszeit zu verbessern.

Schmelzkurvenanalytik

Wenn die Schmelzkurven höhere T_m zeigen oder weiter gestreut sind, als bei den Original RocheKapillaren, dann empfehlen wir bei der Messung den Temperaturanstieg pro Zeitintervall zu verkleinern (weniger als 0.1 increments).

Probenverwendung nach der PCR

Wenn Sie die PCR Reaktion mittels Gelelektrophorese untersuchen wollen, dann ist es am einfachsten die Polycarbonatkapillaren mit dem „Kopf“ nach unten in ein 2.0 ml Reaktionsgefäß zu stellen und den PCR durch kurzes anzentrifugieren in einer Tischzentrifuge aus der Kapillare zu zentrifugieren. Die PCR-Reaktionslösung kann dann anschließend entsprechend der speziellen Anforderung weiter verarbeitet werden.

Manual Contents

Subject	Page
Contents of Kit, Storage Information	1
Description	2
Sample preparation / PCR preparation	2
Handling capillaries and caps	2
Carousels	2
LightCycler® centrifuge adaptors	3
Performing PCR / PCR programme	3
Fluorescence Detection	4
Melting Curve Analysis	4
Sample recovery after PCR	4
Beschreibung	5
Bereitstellung der Probe / PCR Reaktion	5
Handhabung der Kapillaren und Deckel	5
Karussells	5
LightCycler® Zentrifugenadaptoren	6
Durchführung der PCR / PCR Programm	6
Fluoreszenz Detektion	7
Schmelzkurvenanalyse	7
Probenverwendung nach der PCR	7

Kit Contents & Storage Information

I2250.0961 contains 1 carousel for use in the LightCycler® Version 1.2/1.5.
2 x 96 capillaries and caps and 1 transfer-pin for handling the caps.

I2250.0962 contains 1 carousel for use in the LightCycler® Version 2.0.
2 x 96 capillaries and caps and 1 transfer-pin for handling the caps.

Capillaries can be used for either LightCycler® Version, respective either carousel.

Capillaries are certified DNase, RNase and Protease free.

Capillaries, carousels and transfer-pin can be stored for long term at Room Temperature without loss of their usability.

Beschreibung

Probenvorbereitung / Benutzung der LightCycler® Zentrifugen Adaptoren

Der PCR-Mastermix (PCR-Ansatz) und weitere Komponenten können einfach in den oberen Teil der Kapillaren pipettiert werden (wie bei den Original Roche Kapillaren). Um die Flüssigkeit bis zum Boden der Kapillare zu bekommen, kann die Kapillare entweder in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß und damit in eine Zentrifuge gestellt werden (sehr kurzes anzentrifugieren reicht), oder, einfacher, die Flüssigkeit einfach durch ein kurzes ruckartiges Schütteln nach unten befördert werden. Letzteres bietet sich vor allem bei geringer Probenzahl an.

In beiden Fällen ist es nicht notwendig, die von Roche zur Verfügung gestellten Zentrifugen Adaptoren zu benutzen. Will man diese trotzdem benutzen ist das ohne Änderung in der Handhabung möglich. Allerdings passen die Genaxxon Kapillaren nicht vollständig in die Adaptoren. Da die „Kapillarenköpfe“ oben raus schauen, kann der Rotorendeckel von gängigen Minizentrifugen nicht mehr auf den Rotor gesetzt werden. Das wäre aber auch nicht notwendig, da nur kurz anzentrifugiert werden muss.

Durchführung der PCR / PCR Programm

Die Genaxxon Polycarbonatkapillaren haben einen etwas größeren Durchmesser und eine dickere Wandung als die 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, ist es daher ratsam 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 10 Sekunden zu setzen. Zu kurze Denaturierungs- und Annealingzeiten führen dazu, dass keine PCR stattfindet, oder dass zumindest der Ct/Cp Wert höher liegen wird. Je nach PCR kann es auch notwendig sein die Denaturierungs-, bzw. Annealingzeit auf bis zu 15 Sekunden zu setzen.

Sollten beide Zeiten schon von vorne herein größer als 10 Sekunden programmiert sein, so ist es nicht mehr notwendig, Veränderungen am Programm vorzunehmen. Trotzdem kann versucht werden sowohl die Denaturierungszeit als auch das Annealing um zusätzliche 5 Sekunden zu verlängern, um eventuell bessere Ergebnisse zu erhalten. Wenn die zusätzlichen 5 Sekunden zu keiner Ergebnisverbesserung führen, macht es keinen Sinn eine weitere Verlängerung der entsprechenden Schritte zu testen.

Da die Denaturierungseffizienz vor allem auch vom GC-Gehalt der Probe abhängt, kann es vorkommen, dass selbst bei deutlich verlängerter Denaturierungszeit eine nicht optimale PCR stattfindet. In diesem Fall ist es sinnvoll, die Denaturierungstemperatur von 95°C auf 97°C zu setzen (nicht länger als 10 sec.).

ANMERKUNG: Längere Denaturierungszeiten (als 15 sec.) haben selten einen positiven Effekt

Beispiele für einige Temperaturprogramme folgen auf der folgenden Seite.

Beschreibung

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 und benutzt werden. Alle PCR-Mastermixe, die mit Glaskapillaren funktionieren, können ohne Probleme in den Polycarbonatkapillaren benutzt 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 Kapillarendeckel 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.

Die Kapillaren können und sollen, im Gegensatz zu den Glaskapillaren von Roche, fest in die vorgesehenen Kavitäten im Karussell gedrückt werden. Es ist nicht zu befürchten, dass die Kapillaren zerbrechen, oder sonst einen Schaden erleiden.

Die Karussells

Genaxxon bietet 2 Typen des 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. Das Genaxxon Karussell 1.2/1.5 passt nur in den LightCycler® 1.2/1.5. Das Karussell wiegt ca. 20 g mehr, als das entsprechende Karussell 2.0 und kann daher nur im entsprechenden Zentrifugenrotor verwendet werden. Es soll auf keinen Fall zusammen mit dem Zentrifugenrotor für das LightCycler® Karussell 2.0 benutzt werden.

ANMERKUNG: Genaxxon übernimmt keine Haftung für die falsche Verwendung des Karussells in der Zentrifuge.

Das Karussell 2.0 passt sowohl in den LightCycler® 1.2/1.5 sowie den LightCycler® 2.0. Da das Karussell aber ca. 20 g leichter ist, als das Karussell 1.2/1.5 kann es nur mit dem Zentrifugenrotor für die Version 2.0 benutzt werden!

ANMERKUNG: Genaxxon übernimmt keine Haftung für die falsche Verwendung des Karussells in der Zentrifuge.

Bitte informieren Sie Genaxxon über die in Benutzung stehende LightCycler® Version.

Description

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. All PCR-Mastermixes that work in glass capillaries will also work in polycarbonate capillaries.

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 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 pressing the caps tightly into the capillaries.

To ensure that the capillaries fit in the cavities of the carousel, the capillaries have to be pressed into these cavities. In opposite to the glass capillaries from Roche, it will not harm the capillaries nor break them.

The Carousels

Genaxxon offers 2 types of carousels that fit to LightCycler® Version 1.2/1.5 or to Version 2.0 respectively. The carousel type 1.2/1.5 will only fit into the LightCycler® Version 1.2/1.5. It will not be possible to use it in the LightCycler® Version 2.0. As this carousel weights about 20 g more than the 2.0 Version it is not recommended to use it in the centrifuge together with the centrifuge rotor for the LightCycler® carousel Version 2.0.

NOTE: Genaxxon is not liable for any damage that occurs for the wrong usage of the carousel in the centrifuge.

The LightCycler® carousel 2.0 will fit in the LightCycler® 1.2/1.5 as well as the LightCycler® 2.0. As this carousel is about 20 g lighter than the 1.2/1.5 type it can only be used in the centrifuge with the appropriate rotor for the LightCycler® 2.0 carousel!

NOTE: Genaxxon is not liable for any damage that occurs for the wrong usage of the carousel in the centrifuge.

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

Description (continued)

Using LightCycler® centrifuge adaptors

PCR master mixes and additional components can be easily pipeted into the upper part of the capillaries (exactly as with the glass capillaries from Roche). To get the liquid to the bottom of the capillaries, the capillaries can be put into a 1.5 ml reaction tube (cut caps or close them) and then be transferred to a table top centrifuge (very short centrifugation (1-2 sec.) is enough to get the liquid down). An even easier possibility is to “shake” the liquid down with a short jerk.

In either cases it is not necessary to use the centrifuge adaptors from Roche. If you want to use the adaptors, this will be possible without changes in handling compared to the glass capillaries from Roche. The Genaxxon capillaries however do not fit completely in the Roche centrifuge adaptors (the capillary head will stick out). For that reason it will not be possible to put the rotor lid on top of the centrifuge rotor of mini centrifuges. As a very short centrifugation is enough to transfer the liquid from the top of the capillaries to the bottom is not necessary to put the rotor lid on the rotor.

Performing PCR / PCR programme

The Genaxxon polycarbonate capillaries have a bigger diameter and are more thick walled than the 20 µl glass capillaries from Roche. For this reason and to guarantee effective heat transfer from the outside of the capillaries to the middle of the PCR reaction, 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 10 seconds at 95°C for the denaturing step and 10 seconds for the annealing step. Too short denaturing and annealing times will lead to a complete failure of your PCR, or at least to higher Ct/Cp values. According to the specific PCR it might even be necessary to use a denaturing time of 15 seconds.

If you are already using a programme with both times higher than 10 seconds, it should not be necessary to make changes in the program. Nevertheless you can try to increase the existing denaturing and/or annealing times by additional 5 seconds. If this will not lead to better results it makes no sense to increase denaturing and/or annealing times further.

As the easiness of denaturing DNA depends on the GC-content of your DNA, it might be better to increase the denaturing temperature from 95°C to 97°C (for not longer than 10 sec.). Longer times will not improve results.

NOTE: Longer denaturing times at 97°C will rarely give better results.

Some examples of temperature protocols are shown on the next page.

Example (95°C Denaturing)

	Glass	Polycarb.	Glass	Polycarb.	Glass	Polycarb.
Denaturing	0 sec.	10 sec.	5 sec	10-12 sec	> 7 sec	> 10 sec
Annealing	0 sec.	10 sec	5 sec	10-12 sec	> 7 sec	> 10 sec
Extension	10 sec.	10 sec.	5 sec	5-8 sec	> 7 sec	> 7 sec

Example (97°C Denaturing)

	Glass	Polycarb.	Glass	Polycarb.	Glass	Polycarb.
Denaturing	0 sec.	5 sec.	5 sec	7-10 sec	> 7 sec	< 10 sec
Annealing	0 sec.	10 sec	5 sec	10 sec	> 7 sec	> 10 sec
Extension	10 sec.	10 sec.	5 sec	5-8 sec	> 7 sec	> 7 sec

Fluorescence Detection

All standard dyes (probes) can be detected while using the Genaxxon polycarbonate capillaries.

It might be a problem to detect ROX in the PCR reaction. If you use ROX and you get no PCR signal at all, perform a standard gel electrophoresis. If you can see a DNA-band, but you get no Real-Time-PCR signal it will not be possible to improve the PCR by changing temperatures or hold-times.

Melting Curve Analysis

If the melting curves show higher values or are spread over a wider range while analysing a dilution series, it is recommended to decrease the slope of the heating step (less than 0.1 increments).

Sample recovery after PCR

If you want to analyse the PCR reaction on a gel it is the easiest way to cut the capillaries with scissors and spin the solution into a clean reaction tube from which you can pipet the PCR reaction to a gel or what ever purpose you need the PCR reaction for.

It will be also possible to remove the caps and put the capillaries upside down into a reaction tube spinning the tube with the capillary.