



**Der qPCR-Vortrag,  
von dem sich Dein PI wünscht,  
Du hättest ihn gehört**

**Promega GmbH**

Lab Supply



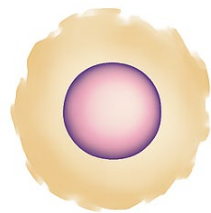
# Stimulus-Triggered Acquisition of Pluripotency (STAP)

ARTICLE

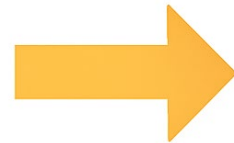
doi:10.1038/nature12968

## Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency

Haruko Obokata<sup>1,2,3</sup>, Teruhiko Wakayama<sup>3†</sup>, Yoshiki Sasai<sup>4</sup>, Koji Kojima<sup>1</sup>, Martin P. Vacanti<sup>1,5</sup>, Hitoshi Niwa<sup>6</sup>, Masayuki Yamato<sup>7</sup> & Charles A. Vacanti<sup>1</sup>



Lymphozyten



Säurebad



Pluripotente Zellen

# „STAP Cell Scandal“

---

News | Published: 18 March 2014

**Stem-cell method faces**

The STAP case scandal: Researcher Haruko Obokata  
resigns after failing to

ta

News | Published: 01 April 2014

**Stem-cell scientist found guilty of misconduct**

STAP Cell Scandal: Japan's Biggest Science Fraud

## The Final Word on STAP

*Researchers fail to replicate STAP study; computational analysis reveals genomic inconsistency*

---

# Lessons Learned: Warum Standards wichtig sind

---

## MIQE 2.0 Guidelines

Standardisierte Empfehlungen für

- Experimentdesign
- Optimierung
- Validierung
- Analyse
- Ergebnisdokumentation




für qPCR-Experimente

Clinical Chemistry 00:0  
1–18 (2025)

Special Report

---

## MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines

Stephen A. Bustin <sup>a,\*</sup> Jan M. Ruijter,<sup>b</sup> Maurice J.B. van den Hoff,<sup>b</sup> Mikael Kubista,<sup>c</sup> Michael W. Pfaffl,<sup>d</sup> Gregory L. Shipley,<sup>e</sup> Nham Tran,<sup>f</sup> Stefan Rödiger,<sup>g</sup> Andreas Untergasser,<sup>h</sup> Reinhold Mueller,<sup>i</sup> Tania Nolan,<sup>j</sup> Mojca Milavec,<sup>k</sup> Malcolm J. Burns,<sup>l</sup> Jim F. Huggett <sup>l</sup> Jo Vandesompele <sup>m</sup> and Carl T. Wittwer<sup>n</sup>

---

# Was ist Real-Time PCR?

## End-point PCR

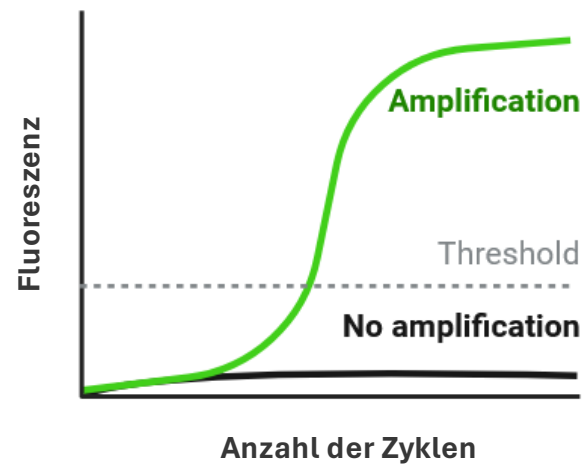
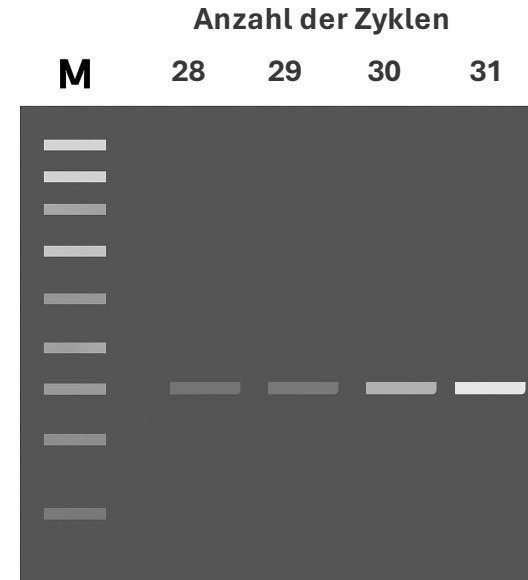
Produktformation wird gemessen

nachdem die  
Reaktion gelaufen ist

## Real-Time PCR = Quantitative PCR (qPCR)

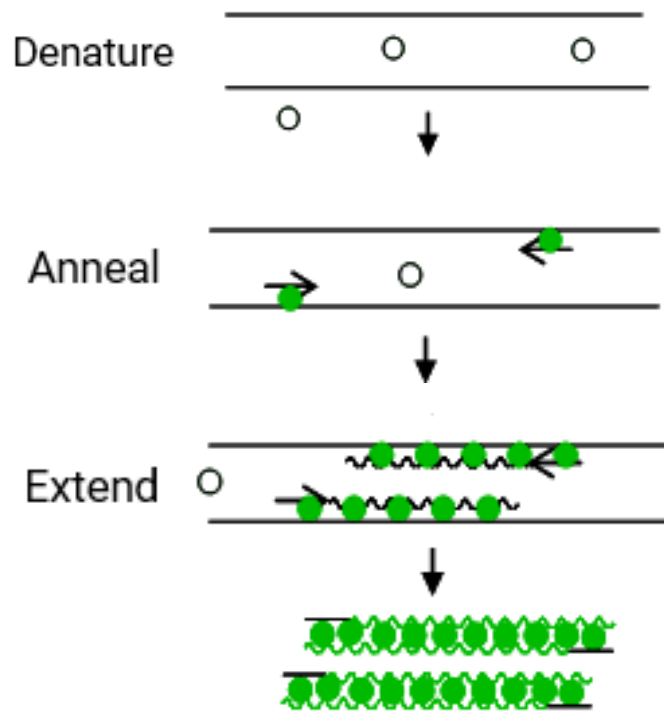
Produktformation wird gemessen

nach jedem Zyklus,  
während der Reaktion

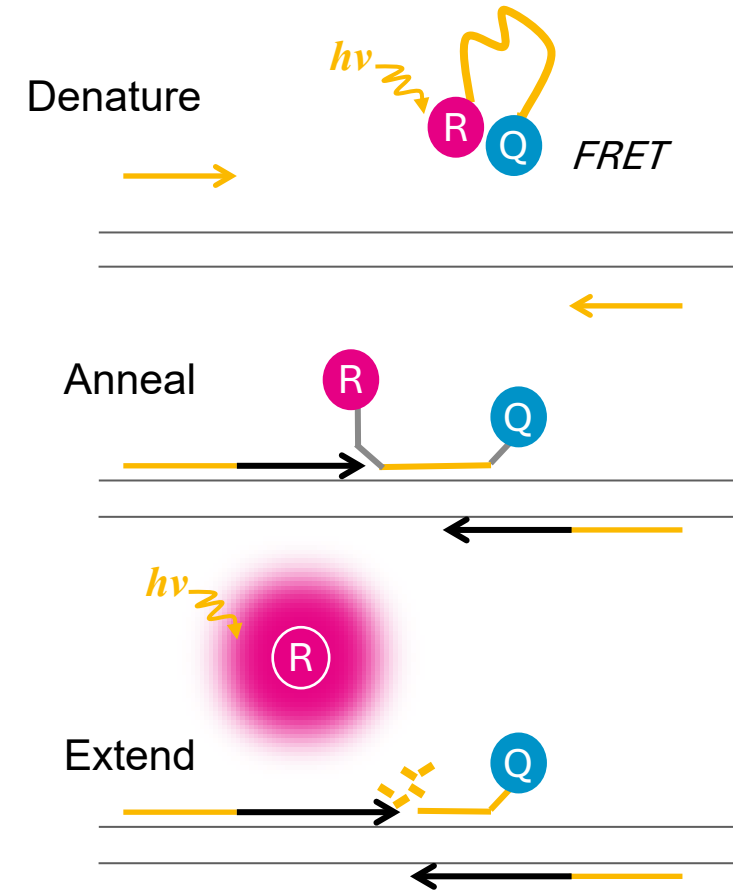


# Real-time PCR: **Farbstoffbasierte** vs. **sondenbasierte** qPCR

## Dye-based

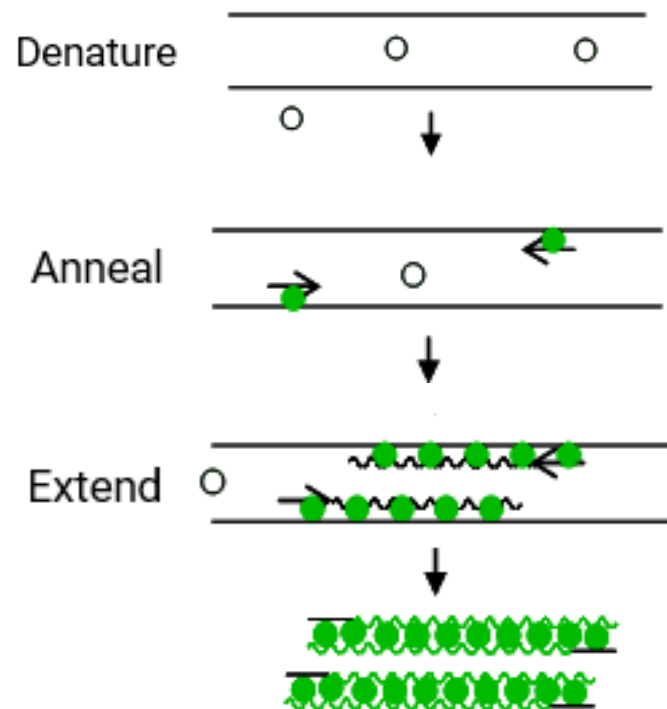


## Probe-based



# Real-time PCR: Farbstoffbasierte qPCR

## Dye-based



- dsDNA-binding dye ist im Mastermix enthalten
- Standard Primer
- Farbstoff assoziiert mit PCR-Produkt

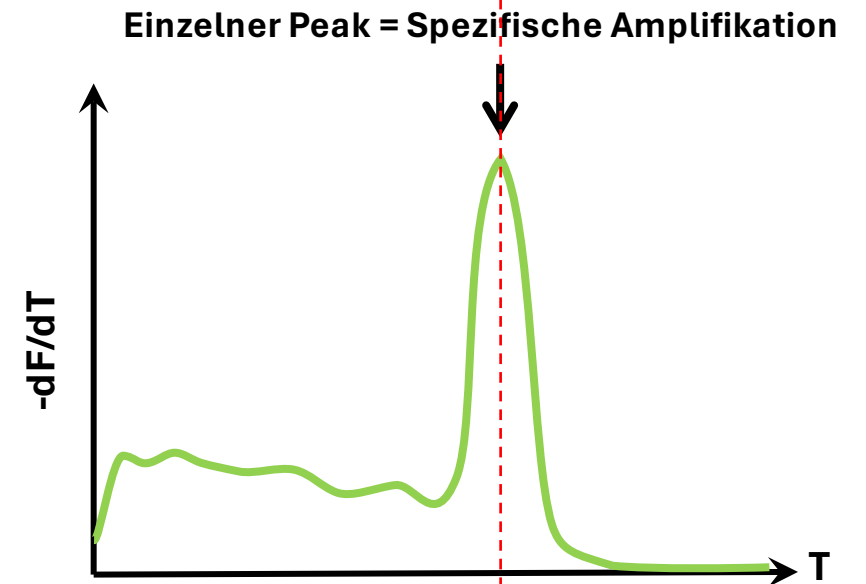
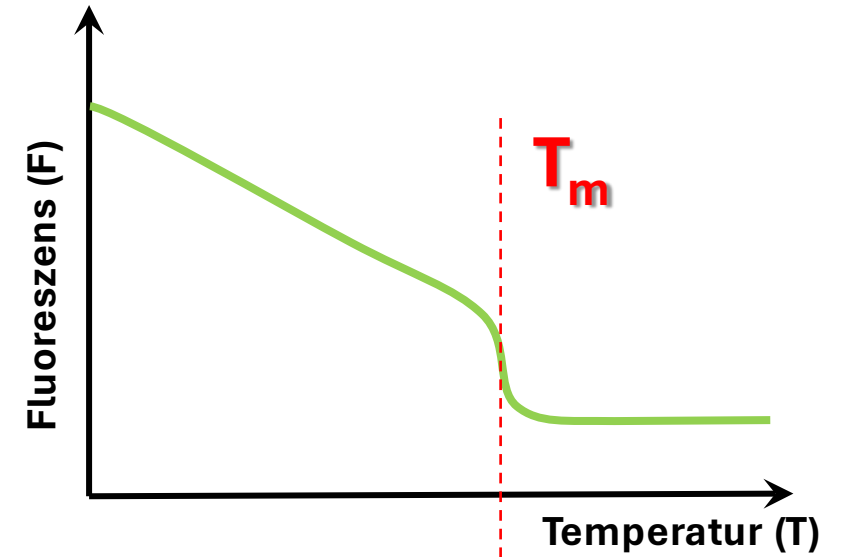
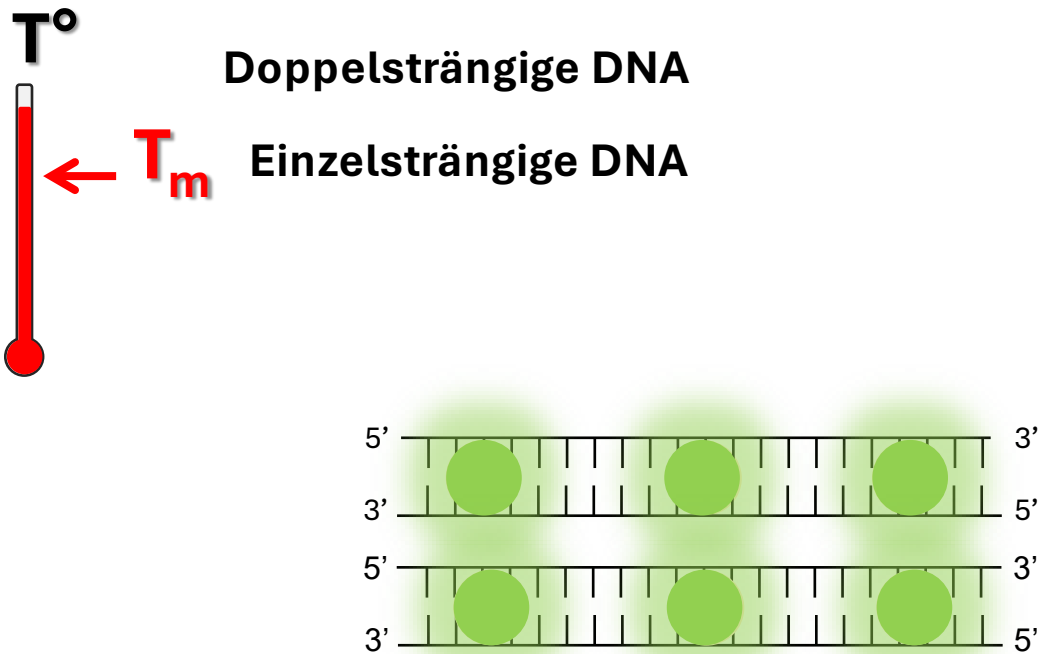
- Freier Farbstoff → geringe Fluoreszenz
- Gebundener Farbstoff → hohe Fluoreszenz

Fluoreszenz ist proportional zur Menge an PCR-Produkt

Je mehr PCR Produkt entsteht, desto mehr Farbstoff wird gebunden

# Schmelzkurve

- = Thermales Profil, das nach der Amplifikation erstellt wird
- zeigt **alle** PCR-Produkte
  - Produkt wird langsam erhitzt, Signal wird kontinuierlich gemessen



→ Bietet qualitative Informationen über spezifische & unspezifische PCR-Produkte

# Real-time PCR: Sondenbasierte qPCR

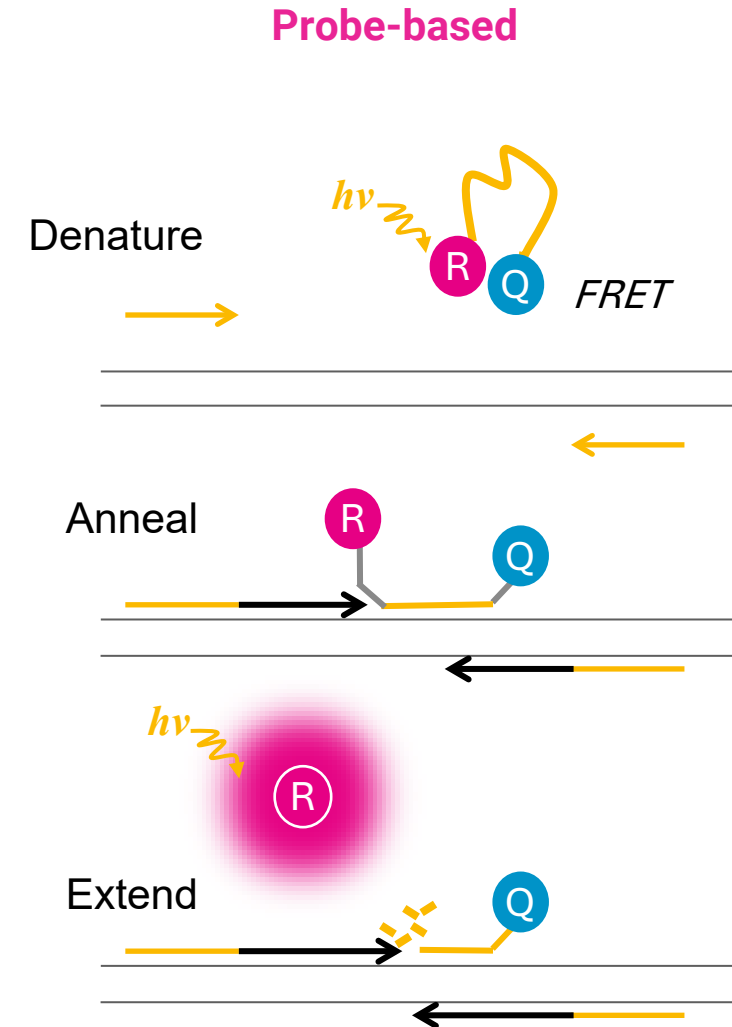
## TaqMan® bekanntestes Beispiel:

- 2 PCR Primer + 1 Sonde
- Sonde ist markiert mit Reporter & Quencher
- Primer & Sonde hybridisieren mit dem Target
- Während der Elongation degradiert die 5' Nukleaseaktivität der Taq Polymerase die Sonde

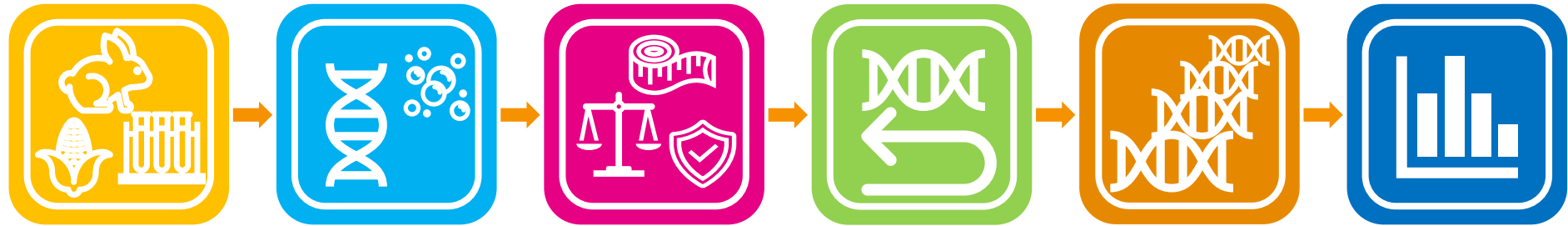
Freie Sonde → FRET

Degradierte Sonde → Reporter nicht mehr gequenched

Fluoreszenz ist proportional zur Menge des spezifischen PCR-Produkts



# Experimentelle Workflows



**RT-qPCR**

Probenentnahme  
& -verarbeitung

RNA  
Extraktion

RNA QC &  
Schutz

Reverse  
Transkription

qPCR

Datenanalyse

**qPCR**

Probenentnahme  
& -verarbeitung

DNA  
Extraktion

DNA QC

qPCR

Datenanalyse

# Was ist generell zu beachten beim Arbeiten mit Nukleinsäuren?

---



- **Handschuhe** regelmäßig wechseln
- **RNase-** und **DNase-freie Umgebung**

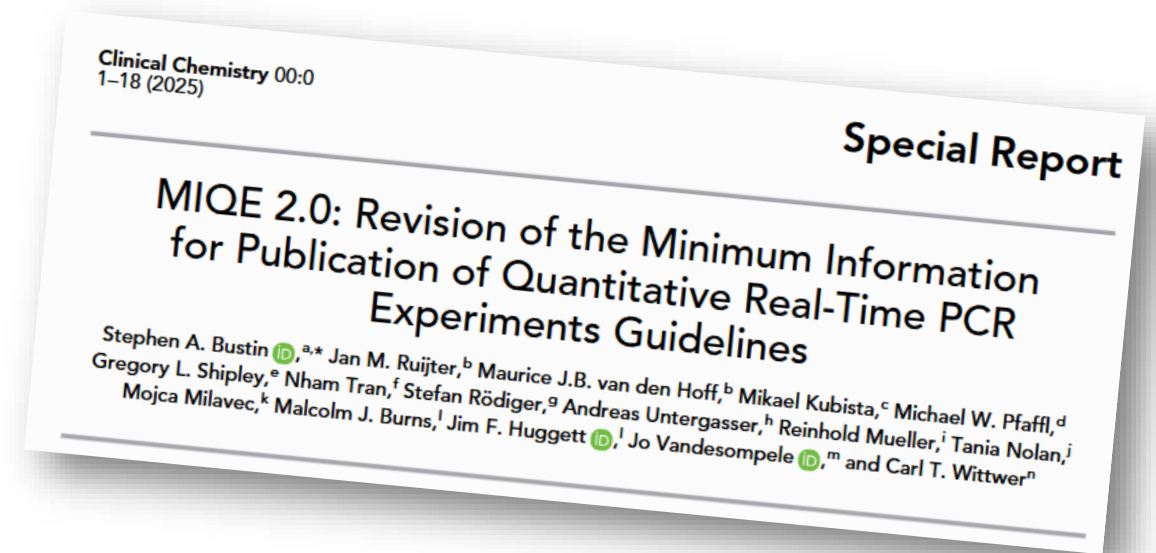
- Kreuzkontamination vermeiden:
  - Sterile, zertifiziert RNase- und DNase-freie **Pipettenspitzen** verwenden
  - **Separater Arbeitsplatz** prä- & post-Amplifikation
  - Uracil N-Glycosylase (**UNG**), **dUTP** anstelle von dTTP
- gDNA-Kontamination vermeiden:
  - Verlängerte Inkubation mit **DNase I**
  - **“gDNA shearing”** mit Spritze



## 5 wichtige Fragen

---

1. Ist meine Probe geeignet für die qPCR?
2. Habe ich richtig normalisiert?
3. Was bedeutet mein Ergebnis und wie interpretiere ich Cq-Werte?
4. Welche Kontrollen sollte ich einbauen?
5. Kann jemand anderes meine Ergebnisse reproduzieren?





# 1. Ist meine Probe geeignet für die qPCR?

Wie bereite ich meine Probe richtig vor?

Maxwell® RSC Instrumente

→ Research Use Only

Isolation von  
hochqualitativer  
DNA, RNA oder TNA  
mittels  
magnetischer Beads



Effizient

bis zu 16 oder 48  
Proben gleichzeitig

Flexibel

Große Bandbreite an Probenarten  
von Aspergillus bis Zebrafisch

Zeitsparend

Durchschnittlich <45  
Minuten pro Run

# 1. Ist diese Probe eine gute Grundlage für meine Quantifizierung?



Wie lagere ich meine Probe richtig?

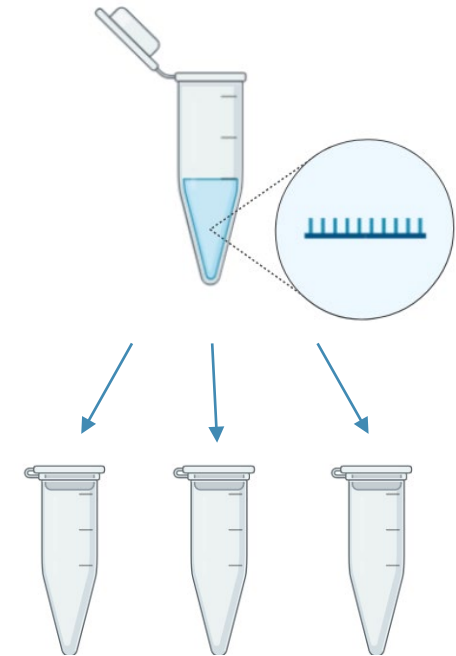
Haltbarkeit extrahierter RNA:

-20°C → Tage

-80°C → Monate

-180°C (flüssiges N<sub>2</sub>) → 5 Jahre

- DNA/RNA in kleine Aliquots
- Vermeidung mehrerer Einfrier- & Auftauzyklen
- Messen der Nukleinsäurekonzentration nach jedem Auftauen



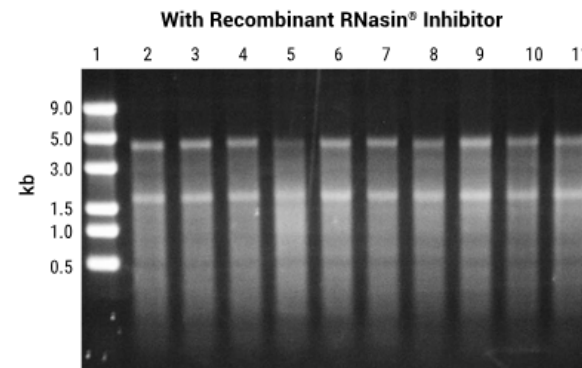
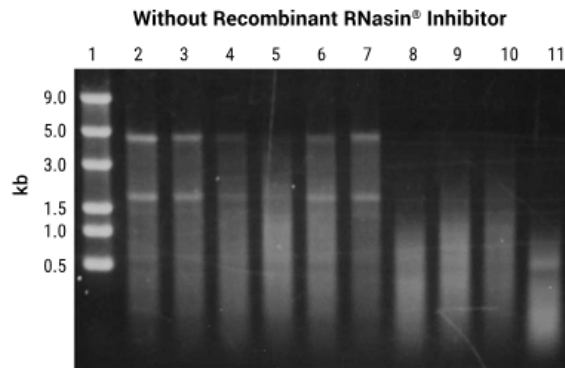


# 1. Ist diese Probe eine gute Grundlage für meine Quantifizierung?

Ist meine Probe intakt oder degradiert?

## Elektrophorese

- Größe
- Integrität
- Quantität



## Dye Staining (QuantiFluor)

- Konzentration (sehr sensitiv)

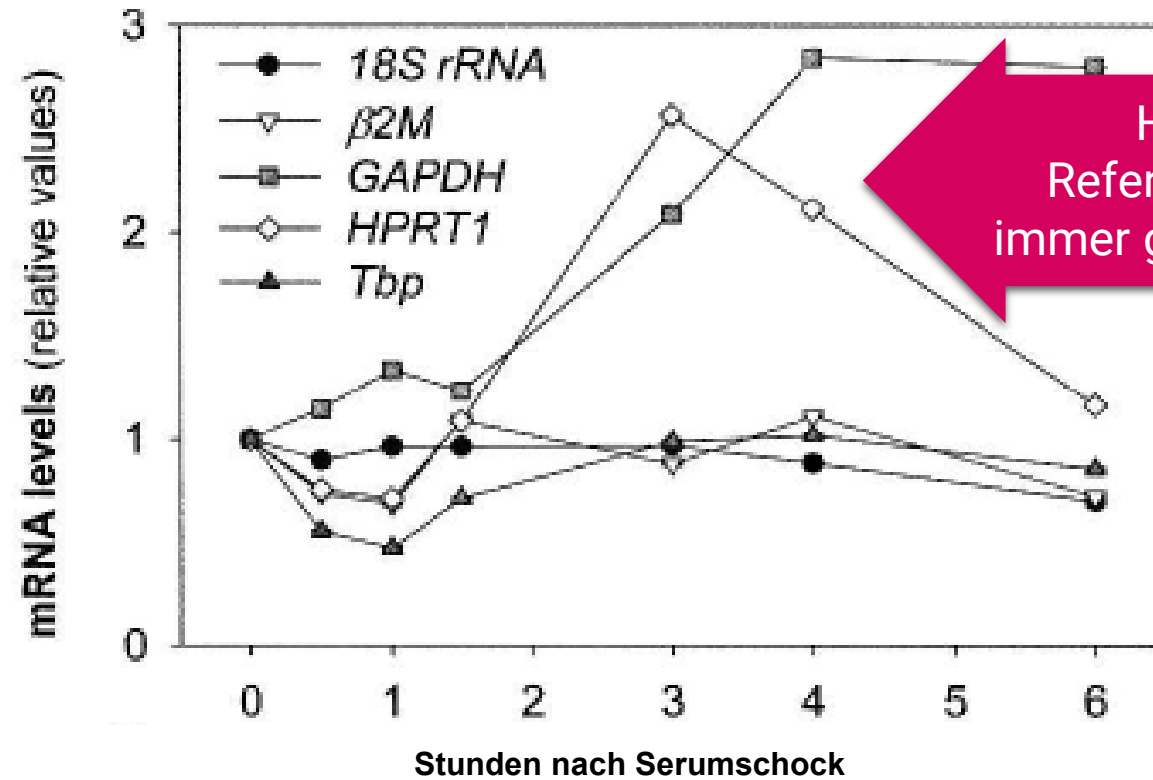


MIQE empfiehlt eine Kombination aus **Elektrophorese & dye staining** um **Größe, Quantität, Konzentration und Integrität** der Probe festzustellen (sagt allerdings nicht über Kontamination aus)

*Qualität ist wichtiger als Ausbeute!*

## 2. Habe ich richtig normalisiert?

### Referenzgene



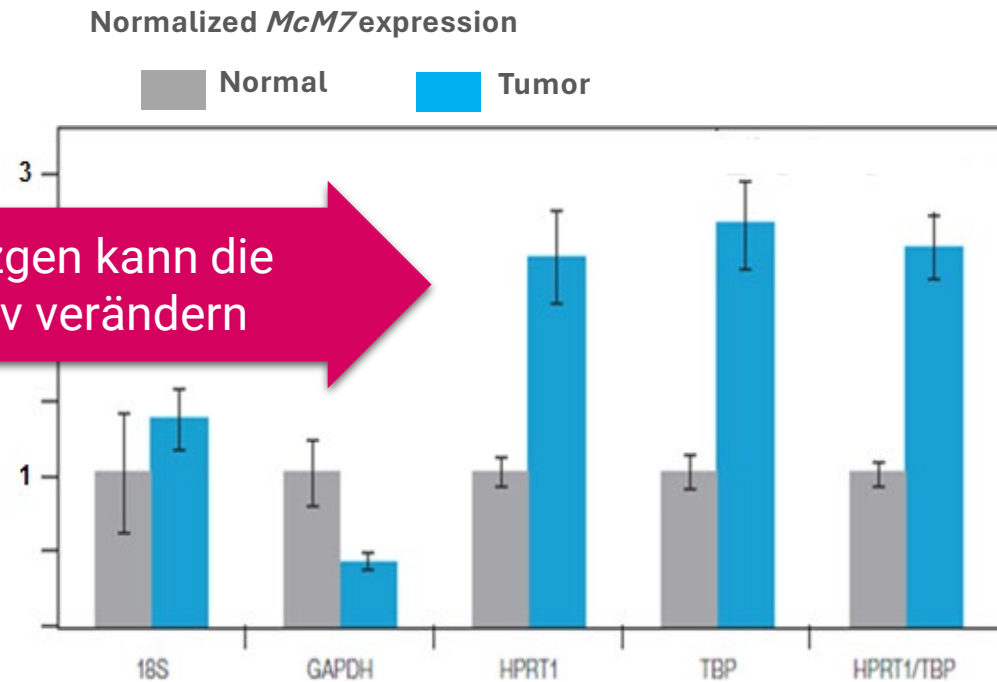
Häufig verwendete Referenzgene werden nicht immer gleichbleibend exprimiert

Garabino-Pico, E. et al. (2007) RNA

## 2. Habe ich richtig normalisiert?

### Referenzgene

Das falsche Referenzgen kann die Ergebnisse qualitativ verändern

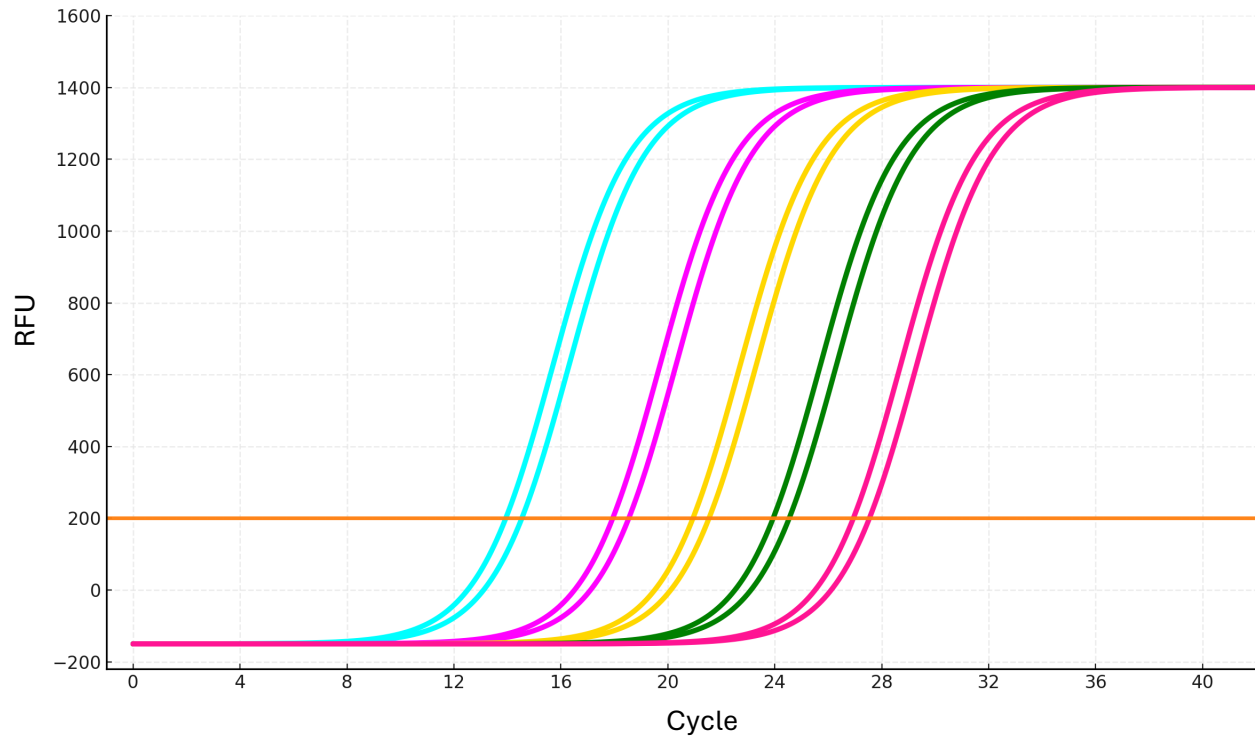


Adapted from Taylor, S. (2011) Bio-Rad tech note 6245

- MIQE empfiehlt mindestens 2 Referenzgene
- Software zum Evaluieren:  
geNORM (<https://genorm.cmgg.be/>)
- Expressionslevel des Referenzgens sollten in ähnlichem Bereich sein wie die des Gene of Interest

### 3. Was bedeutet mein Ergebnis und wie interpretiere ich Cq-Werte?

---

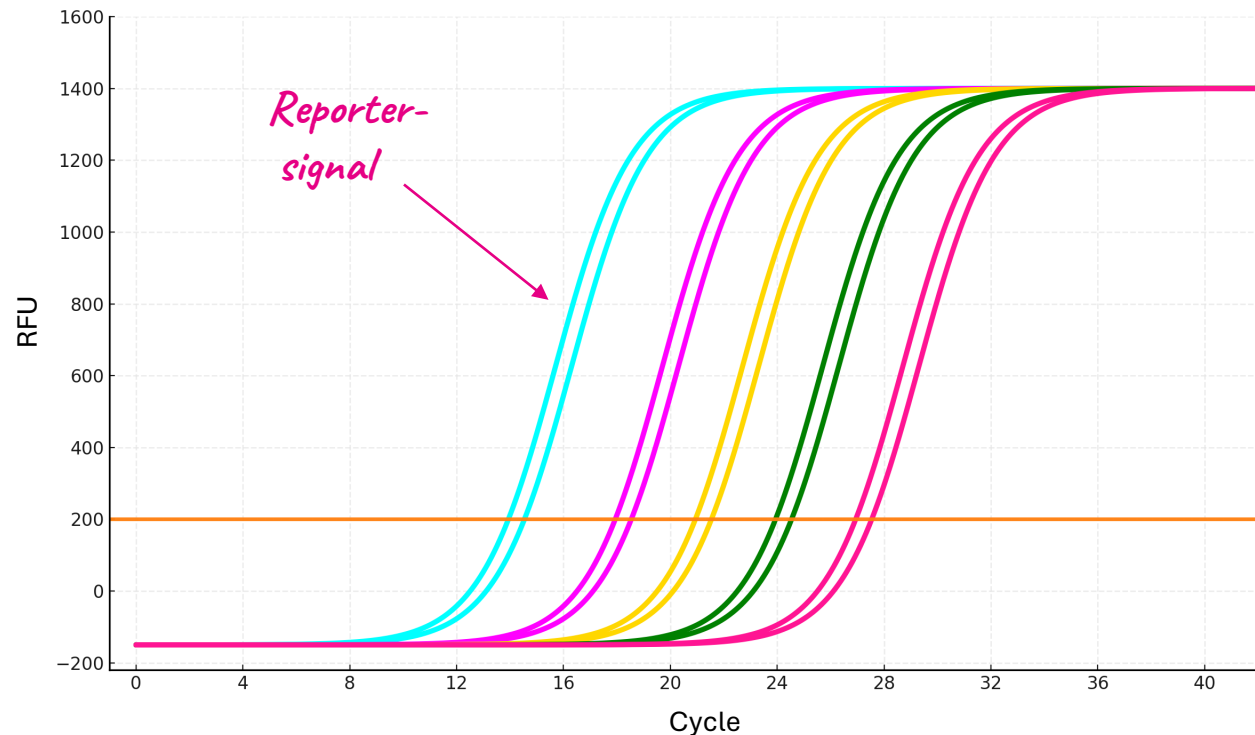


### 3. Was bedeutet mein Ergebnis und wie interpretiere ich Cq-Werte?



**Amplifikationskurve** – zeigt die Anreicherung des Produkts im Verlauf der PCR

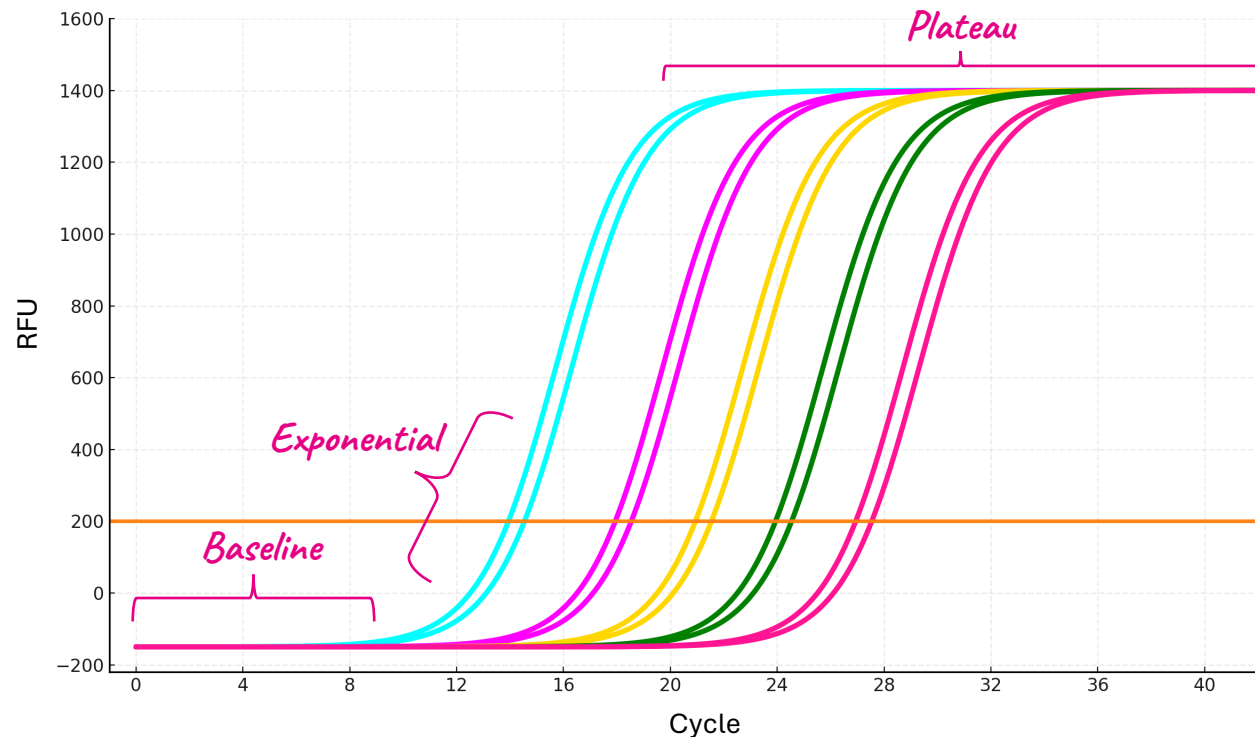
- **Reporter** – Fluoreszenzfarbstoff/Marker zur Erfassung der PCR-Produktbildung
- **RFU** – Relative Fluorescence Unit



# Amplifikationskurve



- **Baseline** – Reporterfluoreszenz, bevor signifikante Produktbildung auftritt
- **Exponentielle Phase** – Stadium der Reaktion, in dem sich das Produkt mit jedem Zyklus verdoppelt
- **Plateauphase** – Stadium der Reaktion, in dem die Geschwindigkeit der Produktbildung abnimmt



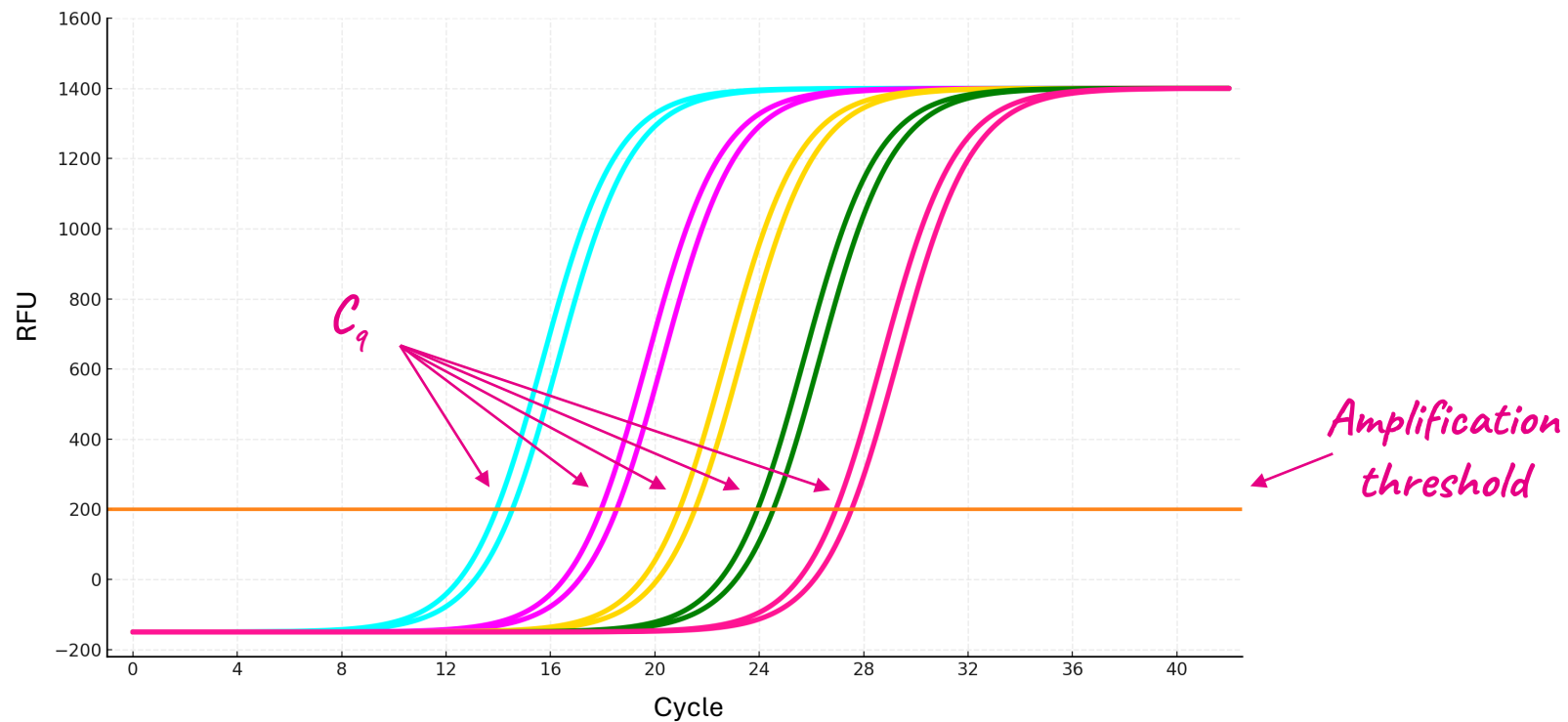


# Was ist ein C<sub>q</sub>-Wert?

**C<sub>q</sub> = quantification cycle**

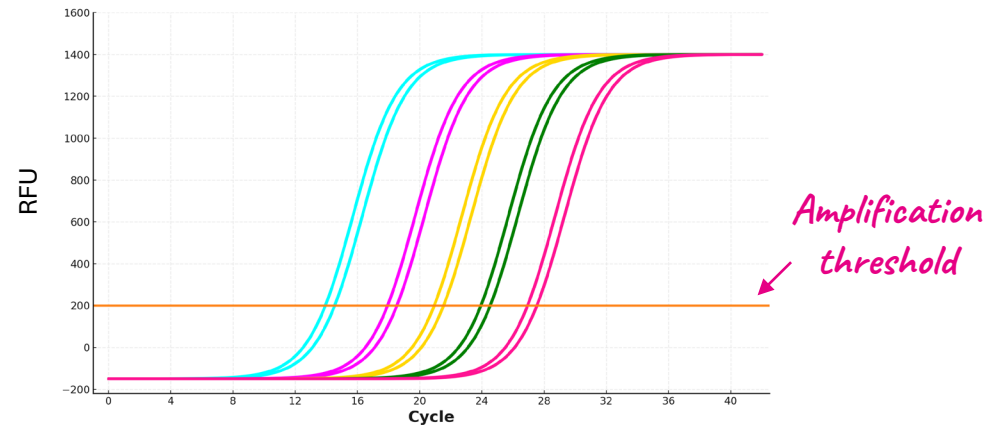
Der Zyklus, bei der die Amplifikationskurve den Threshold überschreitet

**Der C<sub>q</sub>-Wert ist invers proportional zur Menge an Template**



# Was mache ich mit dem Cq Wert?

Cq-Werte sind abhängig davon wie der Threshold gesetzt wird und deshalb nicht direkt vergleichbar



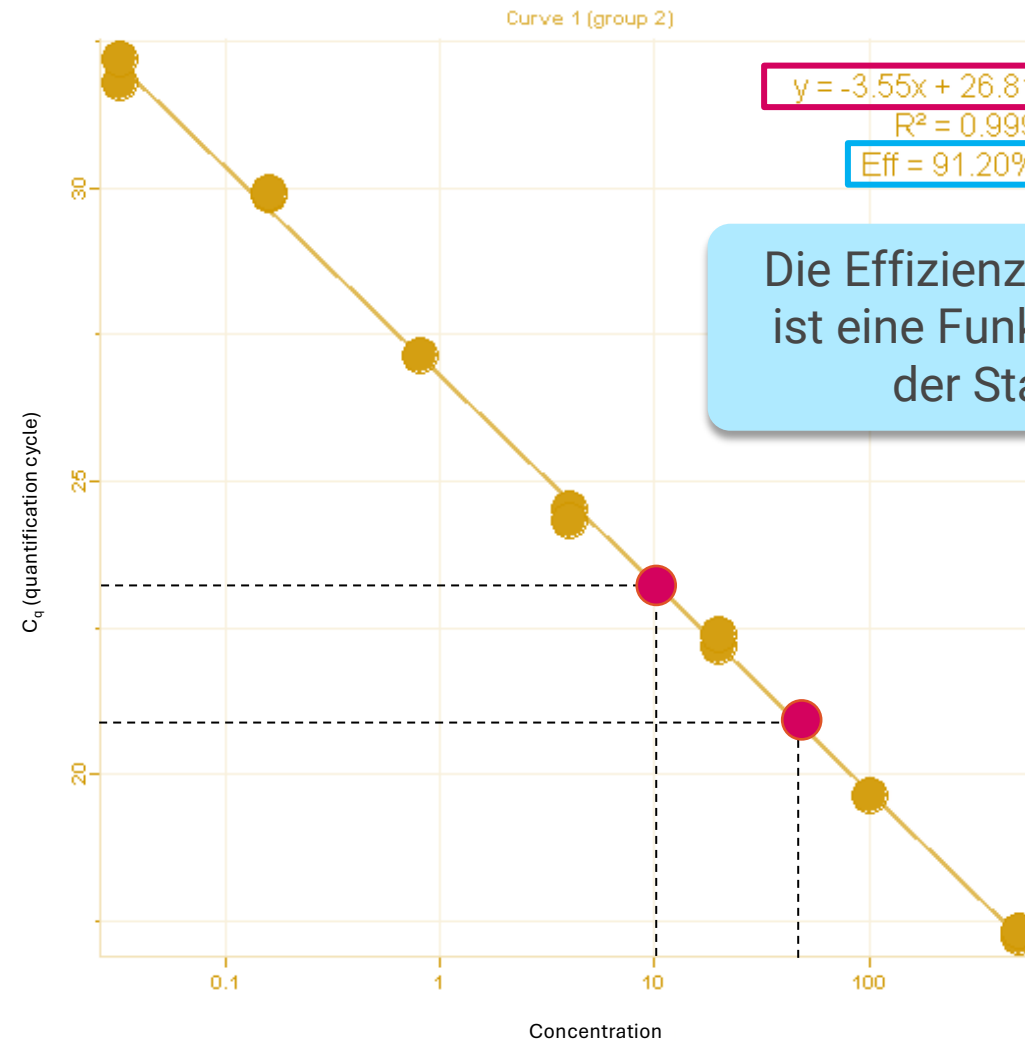
1. **Absolute Quantifizierung** = Messung der Expression eines Zielgens mithilfe einer Standardkurve
2. **Relative Quantifizierung** = Messung der Expression eines Zielgens im Vergleich zu Referenzen



# Absolute Quantifizierung über die Standardkurve

Die Standardkurve wird erstellt, indem C<sub>q</sub> gegen log (Konzentration) aufgetragen wird.

Die Konzentrationen unbekannter Proben werden anhand der Standardkurve aus dem C<sub>q</sub>-Wert abgeleitet.



Die Effizienz der PCR-Reaktion ist eine Funktion der Steigung der Standardkurve



# (Normalisierte) Relative Quantifizierung

Livak and Schmittgen (2001)

- 100% PCR-Effizienz
- 1 Referenzgen

$$NRQ = 2^{\Delta\Delta Cq}$$

$= \Delta C_{q,goi} - \Delta C_{q,ref}$

$$= \frac{2^{-\Delta C_{q,goi}}}{2^{-\Delta C_{q,ref}}}$$

Pfaffl (2001)

- Experimentell bestimmte PCR-Effizienz
- 1 Referenzgen

$$NRQ = \frac{E^{\Delta Cq_{goi}}}{E^{\Delta Cq_{ref}}}$$

$RQ = \frac{2^{-\Delta Cq}}{E}$

PCR-Effizienz

qBase model (2007)

- Experimentell bestimmte PCR-Effizienz
- Multiple Referenzgene

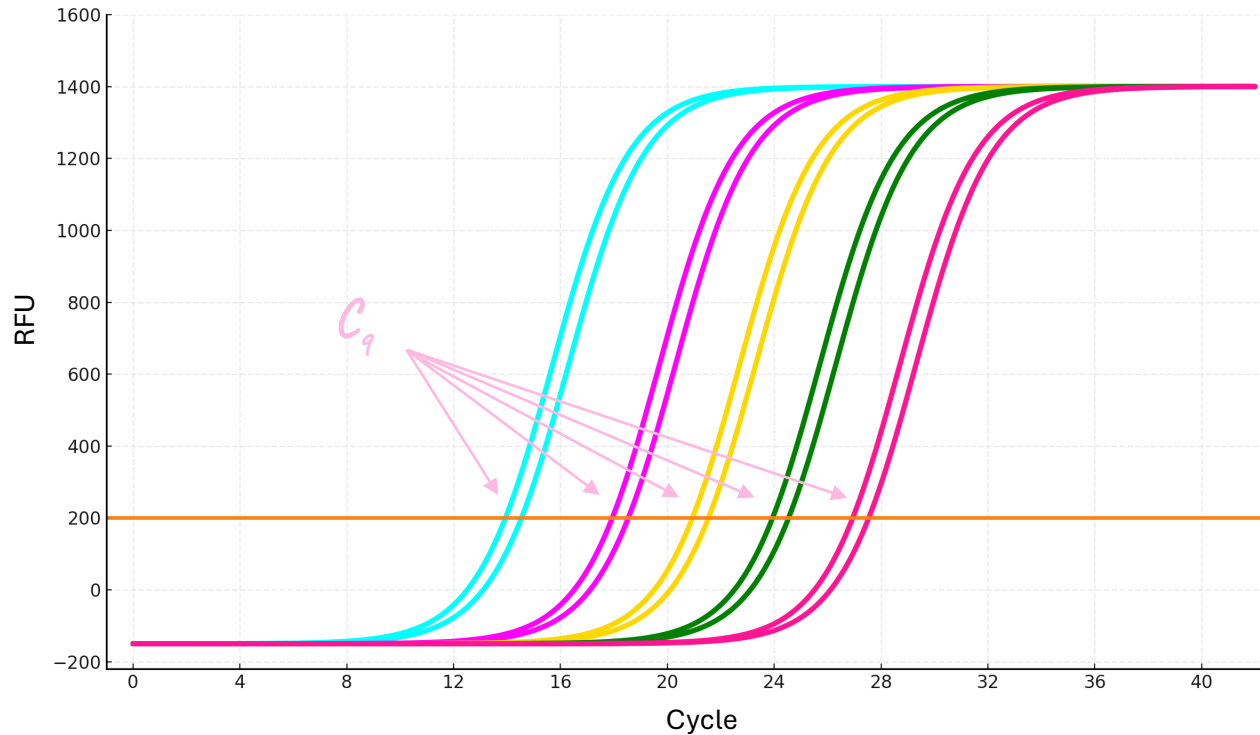
$$NRQ = \frac{E^{\Delta Cq_{goi}}}{\sqrt[n]{\prod_i^n E^{\Delta Cq_{ref_i}}}}$$

Geometrisches Mittel

# Keine Sorge!

Jede Real-Time-Software kann diese Funktionen ausführen

- Automatisch
- Benutzerdefiniert



$$NRQ = \frac{E_{goi}^{\Delta Cq_{goi}}}{\sqrt[n]{\prod_i^n E_{refi}^{\Delta Cq_{refi}}}}$$

Amplification threshold



## 4. Welche Kontrollen sollte ich einbauen?

### Positivkontrolle

- **Zielsequenz (Nukleinsäure)**

*Wenn positiv:*

- Hilft LOD und LOQ zu determinieren
- Legt Sensitivität und linearen dynamischen Bereich des Assays fest
- Erlaubt Detektion potentieller Inhibitoren oder suboptimaler Reaktionsbedingungen
- Hilft beim Festlegen des Thresholds

### Negativkontrolle

- **Träger-Nukleinsäure (nicht Zielsequenz)**

*Wenn positiv:*

- Unbekannte Proben sollten nur dann gewertet werden, wenn ihr Cq-Wert mindestens 5 Zyklen vor dem der Negativkontrolle liegt

### No-RT-Kontrolle

- **Probe ohne Reverse Transkriptase  
(nur RT-qPCR)**

*Wenn positiv:*

- Kontamination mit genomischer DNA

### No Template Control (NTC)

- **Wasser oder Puffer anstelle von Nukleinsäure**

*Wenn positiv:*

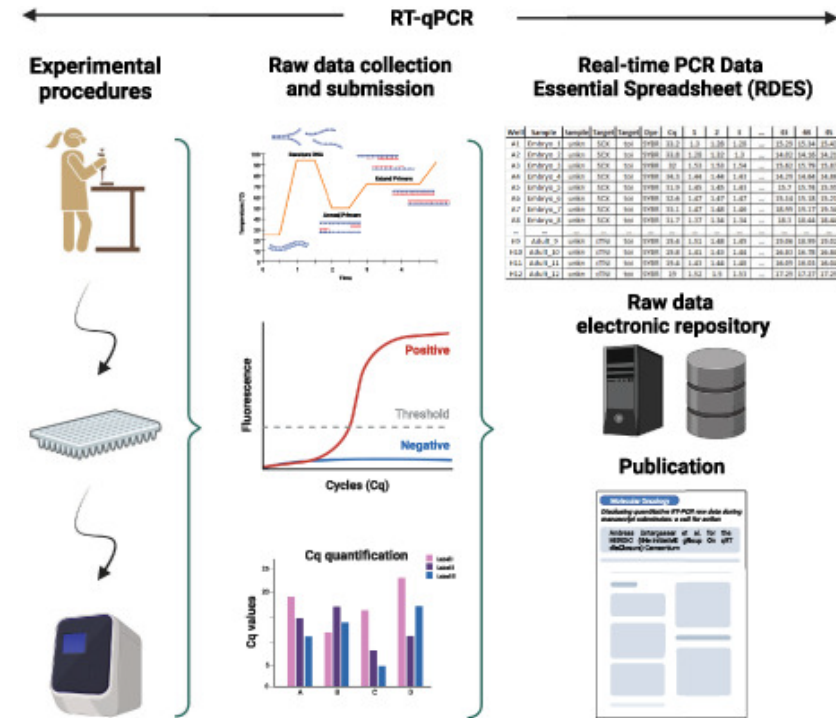
- (Kreuz-) Kontamination = Ergebnisse des kompletten Experiments sind ungültig oder sollten mit sehr viel Vorsicht interpretiert werden



# 5. Kann jemand anderes meine Ergebnisse reproduzieren?

## Rohdaten unbedingt speichern!

- Rohdatenexport
- Thresholding Methode
- Baseline Einstellungen



Adapted from Untergasser *et al.*, 2023

MIQE empfiehlt Rohdaten im Anhang/Supplementary Material als RDES or RDML Datei zu zeigen



# Für jede Probe der richtige Mix!

Produkt	GoTaq® qPCR	GoTaq® Probe	GoTaq® Enviro	GoTaq® Endure
Detektionsmethode	farbstoffbasiert	sondenbasiert	sondenbasiert	sondenbasiert
Geeignet für	Fast alle Proben	Fast alle Proben	Umweltproben	Proben mit vielen Inhibitoren
Inhibitorresistenz	✓	✓	✓ ✓ ✓	✓ ✓ ✓



# Probe-based GoTaq® Endure Master Mix

Inhibitoren wie EDTA oder Huminsäure können die qPCR-Ergebnisse verfälschen!

Wenn Sie Proben mit vielen PCR-Inhibitoren testen möchten, verwenden Sie einen Mastermix der resistent ist!

**Besuchen Sie unseren  
Stand & fragen Sie Ihr  
kostenloses Sample an!**




## GoTaq® Endure qPCR & RT-qPCR Mastermixe

Geeignet für eine Vielzahl von Proben:

- ✓ Blut
- ✓ Bakterien
- ✓ Viren
- ✓ Stuhl
- ✓ Boden
- ✓ Pflanzen
- ✓ Lebensmittel



**Jetzt gratis testen!**

 Sondenbasiert

 Extrem hohe  
Inhibitortoleranz

 Fast-Cycling-  
kompatibel

 Multiplex-fähig



# Geschichte von



**1978**  
Bill Linton beginnt  
Restriktionsenzyme  
zu verkaufen  
in UW-Madison



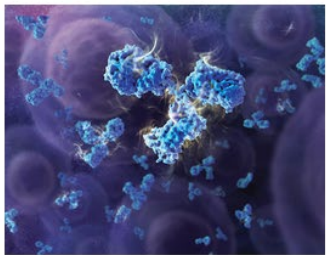
**1980**  
Promega zieht nach  
Fitchburg,  
Wisconsin



**1983**  
Promega eröffnet  
erste internationale  
Ableger

# Lernen mit Promega

## Popular Webinars



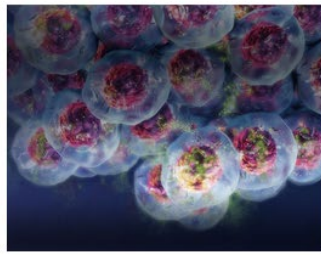
### Antibody Internalization Assay

Learn how a pH sensor fluorescent dye used to identify antibodies suitable for receptor mediated internalization.



### A Guide to CRISPR Mediated Gene Tagging

Learn about a simple and efficient method for CRISPR-mediated HIBIT tagging that requires no molecular cloning.



### Overview of 3D Cell Culture Model Systems

Factors to consider when choosing and validating cell-based assays for use with 3D cultures.



## Promega-Academy

Wissenschaftliche Seminare: Zugespitzt auf Ihre Bedürfnisse!

## Promega Connections

Thoughts, tech tips and news about science

## Nukleinsäure-Analyse

Automatisierte DNA & RNA Extraktion aus jedem Probenotyp



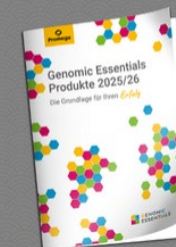
Nukleinsäure-Aufreinigung: modular und flexibel



Manuelle DNA- & RNA-Aufreinigung



Genomics-Produkte



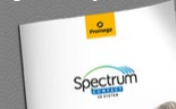
Next Generation Sequencing



Fluorometer zur Nukleinsäurequantifizierung



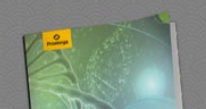
DNA-Sequenzierung & Fragmentanalyse



CE-Instrument für forensische STR-Analyse



Humane Identifizierung



# Technischer Service

---

Besuchen Sie unsere

- **qPCR Seminare**
- **qPCR Workshops**

oder schauen Sie unser **qPCR Webinar!**

Wenn Sie Hilfe mit Ihren (PCR-)Reaktionen brauchen, rufen Sie unseren technischen Service an!



**Dr. Hannah Buntz**

Managerin Trainingslabor

Tel. +49 151 580 421 05

[hannah.buntz@promega.com](mailto:hannah.buntz@promega.com)



# Team Technischer Service

---



Christof  
Brückmann



Sabine  
Wawro



Petra  
Numrich



Thorsten  
Stehlik



Jan  
Adam

Kontaktieren Sie uns gerne bei Fragen oder Problemen!

[de\\_techserv@promega.com](mailto:de_techserv@promega.com)

+49 6227 6906 290


Jetzt kostenloses  
Sample anfragen!

# Vielen Dank!

# Haben Sie Fragen?

Kontaktieren Sie Ihren lokalen Ansprechpartner für mehr Informationen zu Produkten und weiteren Angeboten:

[www.promega.com/c/local\\_sales/sales\\_contacts/](http://www.promega.com/c/local_sales/sales_contacts/)

 Let's connect!

