

PPP Master Mix

(katalogové číslo P124, P125, P126, P126xl)

rev. 01/2022

Popis produktu

PPP Master Mix představuje ideální řešení pro rutinně prováděné PCR reakce. Obsahuje Taq DNA polymerázu a optimalizovaný reakční pufr, vše ve dvojnásobné koncentraci. Pro přípravu vzorku tedy stačí dodat primery, templátovou DNA a vodu a poté je možné ihned zahájit PCR reakci. Další obsažená aditiva a barvivo umožňují posléze okamžité nanášení vzorku na gel bez nutnosti přidávat vkladací pufr.

Rychlá příprava (2x koncentrovaný)

- Kit obsahuje 2x koncentrované komponenty nezbytné pro průběh PCR reakce. To umožňuje rychlou přípravu reakční směsi bez nutnosti rozmrazování jednotlivých komponent. Stačí dodat primery, templátovou DNA a doplnit H₂O (součást balení).
- PPP Master Mix je mimořádně vhodný pro rutinní vyšetřování větších počtů vzorků. K PPP Master Mixu v originální zkumavce je možné přidat požadované primery a doplnit PCR H₂O. Takto připravený Master Mix lze poté dlouhodobě skladovat při -20°C a vlastní přípravu PCR lze pak omezit pouze na smíchání této reakční směsi s analyzovanou DNA tak, aby výsledná koncentrace Master Mixu byla 1x.

Okamžité nanášení na gel

- K amplifikovaným vzorkům není potřeba přidávat vkladací pufr. Kit obsahuje barvivo a aditiva, která umožňují nanášení vzorku na gel a elektroforézu ihned po ukončení PCR reakce.
- Barvivo migruje v čele gelu a neinterferuje tak s kvantifikovatelností PCR produktů. Barvivo ani aditiva nemají vliv na průběh amplifikace.

Optimalizovaný reakční pufr

- Obsahuje reakční pufr, který zvyšuje účinnost i specifitu PCR; obsahuje MgCl₂ v koncentraci vhodné pro většinu PCR reakcí.
- Obsahuje stabilizátory, které umožňují krátkodobé skladování při 4°C.

Technické údaje

Komponenty a balení

- 1 zkumavka s 0,5 ml PPP Master Mixu (na 40 reakcí v celkovém objemu 25μl).
- 1 zkumavka s 1,5 ml PCR H₂O.

Skladování

- Krátkodobě (dny) skladovat při teplotě 4°C ± 3°C.
- Dlouhodobě skladovat při teplotě -20°C ± 5°C. Materiál snáší opakované rozmrazování.

Složení:

- PPP Master Mix se dodává 2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva.

Čistota produktu a kontrola kvality

- Čistota Taq DNA polymerázy je ověřena metodou SDS PAGE, kdy enzym migruje jako jediný proužek o molekulové hmotnosti 94 kD. Preparát neobsahuje nukleázy.
- Každá šarže PPP Master Mixu je testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
P124	PPP Master Mix (1x)	40 reakcí
P125	PPP Master Mix (5x)	200 reakcí
P126	PPP Master Mix (25x)	1000 reakcí
P126xl	PPP Master Mix (100x)	4x 1000 reakcí



Protokol

Doporučený protokol na přípravu vzorků pro PCR s využitím PPP Master Mixu

1. V tenkostěnných PCR mikrozkušnicích smíchat:

Objem*	Reagens	Finální koncentrace
12,5 µl	PPP Master Mix	1x PPP Master Mix (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl ₂ , 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 2,5 U Taq-Purple DNA polymeráza, stabilizátory a aditiva)
1 µl	5' primer	0,1 - 1 µM (~ 20 bází)
1 µl	3' primer	0,1 - 1 µM (~ 20 bází)
1 µl	templátová DNA	
9,5 µl	PCR H ₂ O	do finálního objemu 25 µl

*Lze použít i jiné objemy, jedinou podmínkou je, aby byl PPP Master Mix naředěn 2x a aby byly dodrženy finální koncentrace.

2. Zamíchat na vortexu, krátce centrifugovat.

3. Přidat ~ 20 µl PCR oleje (kat. č. P043) pro omezení vypařování (není nutné při použití cyklerů s vyhřívaným víčkem).

4. Provést PCR za podmínek optimalizovaných pro konkrétní dvojici primerů. Běžné cyklovací parametry jsou:

	Teplota	Doba	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94°C	1 min	1
Denaturace	94°C	15 s	25-35
Nasednutí primerů	55-68°C ¹	15 s	
Extenze	72°C	1 min na 1 kb	
Finální extenze	72°C	7 min	1
Chlazení	22°C		

¹ Je vhodné zjistit experimentálně; obvykle o 5°C nižší než teplota tání (T_m) primerů.

5. Amplifikovaná DNA může být nanášena přímo do agaróзовého gelu bez přídavku nanášecího pufru.

Protokol pro tzv. „Hot start“ PCR (pro snížení amplifikace nežádoucích fragmentů)

1. V tenkostěnných PCR mikrozkušnicích smíchat:

- 1 µl 5' primeru
- 1 µl 3' primeru
- 1 µl templátové DNA
- 9,5 µl PCR H₂O.

2. Zamíchat na vortexu, krátce centrifugovat.

3. Zahřát na 94°C po dobu 1 min (denaturace).

4. Přidat 12,5 µl PPP Master Mix, zamíchat.

5. Přidat ~ 20 µl PCR oleje pro omezení vypařování (není nutné při použití cyklerů s vyhřívaným víčkem).

6. Provést PCR reakci a analýzu vzorků jak je popsáno výše.

PPP Master Mix je mimořádně vhodný pro rutinní vyšetřování větších počtů vzorků DNA. K PPP Master Mixu v originální zkumavce (0,5 ml) je možné přidat požadované primery (např. 2 x 40 µl) a PCR H₂O (380 µl). Vlastní přípravu PCR lze pak omezit pouze na smíchání částí této reakční směsi (např. 24 µl) s analyzovanou DNA (1 µl).