

## Combi PPP Master Mix

(katalogové číslo C208, C209, C210, C210xl)

rev. 01/2022

### Popis produktu

Combi PPP Master Mix obsahuje Taq DNA polymerázu a další komponenty nezbytné pro úspěšný průběh PCR reakce ve dvojnásobné koncentraci. Stačí tedy pouze doplnit primery, templátovou DNA a vodu a vzorek je připraven k PCR. Další obsažená aditiva a barvivo umožňují posléze okamžité nanesení vzorku na gel bez nutnosti přidávat vkládací pufr. Oproti PPP Master Mixu (kat. č. P124-P126) navíc **obsahuje protilátku**, která blokuje aktivitu DNA polymerázy. Protilátka se degraduje až při prvním denaturačním kroku PCR. Tato tzv. hot start PCR je zvláště vhodná všude tam, kde dochází k nežádoucí amplifikaci nespecifických fragmentů DNA, k nízké amplifikaci DNA fragmentů, popřípadě k tvorbě artefaktů vznikajících amplifikací kombinovaných primerů.

### **Hot Start**

- Kit obsahuje monoklonální protilátku, která se váže na Taq DNA polymerázu, tím blokuje její enzymatickou aktivitu a zamezuje amplifikaci nespecifických DNA fragmentů. Protilátka je teplotně inaktivována při prvním denaturačním cyklu PCR.

### **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 H<sub>2</sub>O (součást balení).

### **Okamžité nanášení na gel**

- K amplifikovaným vzorkům není potřeba přidávat vkládací pufr. Kit obsahuje barvivo a aditiva, která umožňují nanesení 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.

### **Vysoká účinnost a citlivost**

- Kit umožňuje velmi citlivou a specifickou amplifikaci požadovaných PCR fragmentů z genomické DNA nebo z komplementární cDNA získané metodou reverzní transkripce; obsahuje MgCl<sub>2</sub> v koncentraci vhodné pro většinu PCR reakcí.
- Přidaná monoklonální protilátka výrazně snižuje tvorbu nespecifických produktů.

## Technické údaje

### **Komponenty základního balení**

- 1 zkumavka s 0,5 ml Combi PPP Master Mixu (na 40 reakcí v celkovém objemu 25 µl).
- 1 zkumavka s 1,5 ml PCR H<sub>2</sub>O.

### **Složení**

- Combi PPP Master Mix se dodává 2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, monoklonální protilátka anti-Taq (38 nM), barvivo, stabilizátory a aditiva.

### **Skladování**

- Skladovat při teplotě -20°C ± 5°C; materiál snáší opakované rozmrazování.

### **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 Combi PPP Master Mixu je testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
C208	Combi PPP Master Mix (1x)	40 reakcí
C209	Combi PPP Master Mix (1x)	200 reakcí
C210	Combi PPP Master Mix (25x)	1000 reakcí
C210xl	Combi PPP Master Mix (100x)	4x 1000 reakcí



## Protokol

### Doporučený protokol na přípravu vzorků pro amplifikaci DNA s využitím Combi PPP Master Mixu

1. V tenkostěnných PCR mikrozkuvkách smíchat:

Objem*	Reagens	Finální koncentrace
12,5 µl	Combi PPP Master Mix	1x Combi PPP Master Mix (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 50 U/ml Taq-Purple DNA polymeráza, monoklonální protilátka anti-Taq (19 nM) 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 <sub>2</sub> O	do finálního objemu 25 µl

\*Lze použít i jiné objemy, jedinou podmínkou je, aby byl Combi 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 vyhříváním 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 <sup>1</sup>	15 s	
Extenze	72°C	1 min na 1 kb	
Finální extenze	72°C	7 min	1
Chlazení	22°C		

<sup>1</sup> Je vhodné zjistit experimentálně; obvykle o 5°C nižší než teplota tání (T<sub>m</sub>) primerů.

5. Amplifikovaná DNA může být nanášena přímo do agarozového gelu bez přídavku nanášecího pufu.

#### Combi PPP Master Mix je mimořádně vhodný pro rutinní vyšetřování větších počtů vzorků DNA.

K roztoku Combi PPP Master Mixu v originální zkuvkě (0,5 ml) je možné přidat požadované primery (např. 2x 40 µl) a PCR H<sub>2</sub>O (380 µl). Vlastní přípravu PCR lze pak omezit pouze na smíchání části této reakční směsi (např. 24 µl) s analyzovanou DNA (1 µl).