

TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix

(Kat. č. T625, T626, T627)

rev. 01/2022

Popis

TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix je určen pro kvantitativní analýzu vzorků pomocí metody qPCR s využitím fluorescenčního barviva SYBR Green I. Tento Master Mix není kontaminován bakteriální a kvasinkovou DNA a je proto zvláště vhodný pro kvantifikaci bakteriální a kvasinkovou DNA. Master Mix obsahuje anti-Taq monoklonální protilátku pro hot-start (HS) PCR. Obsahuje rovněž trehalózu a 1,2-propandiol (TP) a tím umožňuje analýzu obtížně amplifikovatelných vzorků, včetně DNA se zvýšeným obsahem GC a vzorků, které obsahují inhibitory PCR (Horáková a spol., BMC Biotechnology, 11:41, 2011).

Rychlá příprava vzorků

- Všechny konstantní komponenty PCR jsou 2x koncentrované (optimalizovaný reakční pufr s přidavkem trehalózy a 1,2-propandiolu, nukleotidy, DNA-free Taq DNA polymeráza, SYBR Green I, a anti-Taq monoklonální protilátka). To umožňuje rychlou přípravu reakční směsi bez nutnosti rozmrazování a přesného dávkování jednotlivých komponent. Stačí dodat primery, templátovou DNA a doplnit PCR H₂O (součást balení).
- TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix obsahuje anti-Taq monoklonální protilátku, která se váže na Taq DNA polymerázu a inhibuje její enzymatickou aktivitu. To umožňuje přípravu vzorků při pokojové teplotě. Hot-start na bázi anti-Taq protilátky nevyžaduje prodloužený inkubační krok pro aktivaci enzymu.
- TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix je mimořádně vhodný pro rutinní vyšetřování větších počtů vzorků DNA. K roztoku Master Mixu v originální zkumavce (0,5 ml) je možné přidat požadované primery (např. 2 x 40 µl) a PCR H₂O (380 µl). Získaný „armed“ Master Mix může být skladován při -20°C. Bezprostředně před použitím je „armed“ Master Mix rozmražen a vlastní příprava qPCR je omezena na smíchání části této reakční směsi (např. 24 µl) s analyzovanou DNA (např. 1 µl).

Technické údaje

Komponenty a balení

- 1 zkumavka s 0,5 ml TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix (na 40 reakcí po 25 µl).
- 1 zkumavka s 1,5 ml PCR Ultra H₂O.

Skladování

- Krátkodobě (dny) při 2°C - 8°C.
- Dlouhodobě (týdny a měsíce) při -20°C ± 5°C.

Složení

- TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix obsahuje: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,4 M trehalóza, 2 M 1,2-propandiol, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, DNA-free Taq DNA polymeráza (50 U/ml), anti-Taq monoklonální protilátka, SYBR Green I, stabilizátory a aditiva.

Kontrola kvality

- Každá šarže TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix je testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA s vysokým obsahem GC a pro absenci bakteriální DNA; ve vzorcích s primery pro bakteriální DNA, ale bez externě dodané templátové DNA nejsou detegovány žádné amplikony po 40 cyklech amplifikace.

Kat. č.	Název výrobku	Množství
T625	TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix	40 reakcí
T626	TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix	200 reakcí
T627	TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix	1000 reakcí



Protokol

Při analýze bakteriální nebo kvasinkové DNA je nutné pracovat za sterilních podmínek
Doporučený protokol pro qPCR s využitím TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix (příklad)

1. V tenkostěnných mikrozkuvkách pro PCR smíchat:

	PCR v 25 μ l*	Výsledná koncentrace
TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix**	12,5 μ l	75 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,2 M trehalóza, 1 M 1,2-propandiol, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl ₂ , 200 μ M každý dNTP, 25 U/ml DNA-free Taq DNA polymeráza, anti-Taq monoklonální protilátka, SYBR Green I, stabilizátory a aditiva
5' primer (50 μ M)	1 μ l	2 μ M
3' primer (50 μ M)	1 μ l	2 μ M
Templátová DNA (1 ng/ μ l - 1 μ g/ μ l); popřípadě 2x ředěná celá krev	1 μ l	0,04 ng – 0,04 μ g DNA/ μ l
PCR Ultra H ₂ O (kat. č. P040)	9,5 μ l	

*Lze použít i jiné objemy, jen je nutné aby TP HS DNA-free 2x SYBR Master Mix byl naředěn 2x a aby byly dodrženy finální koncentrace.

**Před použitím zamraženého Mixu je nutné, aby všechny jeho komponenty byly dokonale rozpuštěny a promíchány. Urychlenému rozpuštění komponent napomáhá krátké zahřátí Master Mixu na 37°C a zamíchání na vortexu.

2. Krátce zamíchat na vortexu a krátce centrifugovat.

3. Provést qPCR za podmínek optimalizovaných pro konkrétní dvojici primerů. Běžné cyklovací parametry jsou:

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94°C	2 min	1
Denaturace	94°C	15 s	25-35
Nasedání primerů	55-65°C	15 s	
Extenze	72°C	1 min na 1 kb	
Finální extenze	72°C	7 min	1
Ochlazení	22°C		

3. Amplifikovaná DNA může být smíchána s vkládacím pufrém (Kat. č. P048, P064 nebo P066) a vpravena do agarózového gelu pro elektroforetickou analýzu.