

PPP Master Mix bez MgCl₂

(katalogové číslo P134, P135, P136, P136xl)

rev. 01/2017

Popis produktu

Jedná se o doplňkový produkt z řady PPP Master Mixů. Oproti klasickému PPP Master Mixu (kat. č. P124-P126) není MgCl₂ přidán přímo do Master Mixu, ale je dodáván odděleně. Pokud je požadovaný produkt PCR reakce obtížně amplifikovatelný, je možné optimalizovat koncentraci MgCl₂ pro získání co nejlepších podmínek pro průběh PCR. Protože tento produkt již obsahuje Taq DNA polymerázu a optimalizovaný reakční pufr ve dvojnásobné koncentraci, stačí pouze doplnit MgCl₂ na požadovanou koncentraci, dodat primery, DNA templát a vodu a zahájit PCR reakci. Další obsažená aditiva a barvivo umožňují posléze okamžité nanesení 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, doplnit MgCl₂ na požadovanou koncentraci a H₂O (oboje je dodáváno jako součást balení).
- Umožňuje snadné určení optimální koncentrace MgCl₂ pro ideální průběh PCR.

Okamžité nanášení na gel

- K amplifikovaným vzorkům není potřeba přidávat vkladací 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.

Optimalizovaný reakční pufr

- Obsahuje reakční pufr, který zvyšuje účinnost i specifitu PCR.
- Obsahuje stabilizátory, které umožňují krátkodobé skladování při 4°C.

Technické údaje

Komponenty základního balení

- 1 zkumavka s 0,5 ml PPP Master Mixu bez MgCl₂ (na 40 reakcí v celkovém objemu 25μl).
- 1 zkumavka s 0,5 ml 25 mM MgCl₂.
- 1 zkumavka s 1,5 ml PCR H₂O.

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, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva.

Skladování

- Krátkodobě (dny) skladovat při teplotě 4°C ± 3°C.
- Dlouhodobě 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 PPP Master Mixu bez MgCl₂ je testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
P134	PPP Master Mix bez MgCl ₂ (1x)	40 reakcí
P135	PPP Master Mix bez MgCl ₂ (5x)	200 reakcí
P136	PPP Master Mix bez MgCl ₂ (25x)	1000 reakcí
P136xl	PPP Master Mix bez MgCl ₂ (100x)	4x 1000 reakcí



Protokol

Doporučený protokol na přípravu vzorků pro PCR s využitím PPP Master Mixu bez MgCl₂

1. V tenkostěnných PCR mikrozkušavkách smíchat:

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

*Lze použít i jiné objemy, jedinou podmínkou je, aby byl PPP Master Mix bez MgCl₂ naředěn 2x a aby byly přibližně dodrženy finální koncentrace.

2. Zamíchat na vortexu, krátce centrifugovat.

3. Přidat ~ 20 µl PCR oleje 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 agarozového gelu bez přídavku nanášecího pufru.

Určování optimální koncentrace MgCl₂

Pokud při standardní PCR (2,5 mM MgCl₂) pozorujeme amplifikaci nežádoucích fragmentů DNA, doporučujeme v první řadě ověřit zda amplifikace probíhá za optimální koncentrace Mg²⁺.

1. připravit finální PPP Master Mix bez MgCl₂ smícháním (pro 9 zkumavek):

112,5 µl PPP Master Mixu
9 µl 5' primeru
9 µl 5' primeru
9 µl templátové DNA

Krátce vortexovat, stočit a rozdělit po 15,5 µl do 8 zkumavek pro PCR.

2. Do jednotlivých zkumavek doplnit 25 mM MgCl₂ a PCR H₂O podle schématu:

Číslo zkumavky	25 mM MgCl ₂	PCR H ₂ O	Finální konc. MgCl ₂
1	5,0 µl	4,5 µl	5,0 mM
2	4,0 µl	5,5 µl	4,0 mM
3	3,0 µl	6,5 µl	3,0 mM
4	2,5 µl	7,0 µl	2,5 mM
5	2,0 µl	7,5 µl	2,0 mM
6	1,5 µl	8,0 µl	1,5 mM
7	1,0 µl	8,5 µl	1,0 mM
8	0,5 µl	9,0 µl	0,5 mM

3. Provést vlastní PCR a obvyklou analýzu vzorků pro určení optimální koncentrace MgCl₂.

PPP Master Mix bez MgCl₂ je mimořádně vhodný pro rutinní vyšetřování větších počtů vzorků. K PPP Master Mixu bez MgCl₂ v originální zkumavce (0,5 ml) je možné přidat požadované primery (např. 2x 40 µl), optimální množství MgCl₂ (určené výše uvedenou metodou) a PCR H₂O do objemu 0,96 ml. Vlastní přípravu PCR lze pak omezit pouze na smíchání částí této reakční směsi (např. 24 µl) a analyzované DNA (1 µl).