

qPCR 2x SYTO-9 Master Mix

(katalogové číslo P591, P592, P593, P593xl)

rev. 02/2017

Popis produktu

qPCR 2x SYTO-9 Master Mix je určen pro náročnější analýzu vzorků pomocí metody qPCR s kvantifikací amplifikovaných DNA fragmentů pomocí interkalačního barviva SYTO-9. Tento Master Mix je vhodný pro amplifikaci delších fragmentů DNA (až do velikosti 1 kb). Zvláště vhodný je pro analýze křivek tání výsledných DNA produktů (tzv. „high-resolution melting analysis“).

SYTO-9

- Produkt obsahuje fluorescenční barvivo SYTO-9, které se po navázání na dvojlátkovou DNA stává silně fluorescentní s maximální excitací 485 nm a emisí 498 nm. Toto spektrum je podobné barvivu SYBR Green I (497/520 nm) a lze jej tedy detekovat při použití shodných optických filtrů. Stejně jako u SYBR Green I je nárůst fluorescence vzorku během elongační fáze PCR reakce přímo úměrný množství amplifikovaných fragmentů.
- Tento Master Mixu je zvláště vhodný při analýze křivek tání s vysokým rozlišením (HRM). Tato analýza umožňuje detekci neznámých mutací, SNP ("single nucleotide polymorphism"), genotypizaci nebo presekvenační skenování amplifikovaných produktů.

Rychlá příprava (2x koncentrovaný)

- Produkt obsahuje všechny konstantní komponenty pro průběh qPCR 2x koncentrované (optimalizovaný reakční pufr, nukleotidy, Taq DNA polymerázu, protilátku anti-Taq, SYTO-9). To umožňuje rychlou přípravu reakční směsi bez nutnosti rozmrazování a přesného dávkování jednotlivých komponent. Stačí dodat primery, templátovou DNA a eventuálně doplnit H₂O (součást balení).

Hot Start

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

Citlivá detekce i delších fragmentů

- Tento produkt je optimalizován pro citlivou a přesnou detekci DNA fragmentů amplifikovaných při qPCR z genomové DNA nebo cDNA, získané metodou reverzní transkripce.
- Umožňuje detekci DNA fragmentů až do velikosti 1kb. Je tedy možné používat primery pro běžnou PCR.

Technické údaje

Komponenty balení

- 1 zkumavka s 0,5 ml qPCR 2x SYTO-9 Master Mixu (toto množství je dostačující např. na 40 reakcí po 25 µl).
- 1 zkumavka 1,5 ml PCR H₂O.

Skladování

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

Složení

- Dodává se 2x koncentrovaný
150mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40mM (NH₄)₂SO₄, 5mM MgCl₂, 400µM dATP, 400µM dCTP, 400µM dGTP, 400µM dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYTO-9, stabilizátory a aditiva.

Kontrola kvality

- Každá šarže qPCR 2x SYTO-9 Master mixu je testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
P591	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	40 reakcí
P592	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	200 reakcí
P593	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	1000 reakcí
P593xl	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	4x 1000 reakcí



Protokol

Doporučený protokol pro přípravu vzorků pro amplifikaci DNA s využitím SYTO-9 qPCR 2x Master Mixu (příklad)

1. V tenkostěnných PCR mikrozkušnicích nebo destičkách pro PCR smíchat:

Reagens	Objem*	Výsledná koncentrace
qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5 µl	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 každý dNTP, 25 U/ml Taq DNA polymeráza, monoklonální protilátka anti-Taq, DNA barvivo SYTO-9, stabilizátory a aditiva
5' primer (50 µM)	1 µl	0,1 - 1 µM (~ 20 bází)
3' primer (50 µM)	1 µl	0,1 - 1 µM (~ 20 bází)
Templátová DNA (1 ng/µl - 1 µg/µl)	1 ul	0,02 ng/µl – 0,02 µg/µl
PCR H ₂ O (kat. č. P042)	9,5 ul	do finálního objemu 25 µl

*Lze použít i jiné objemy, jedinou podmínkou je, aby byl qPCR 2x SYTO-9 Master Mix naředěn 2x a aby byly dodrženy finální koncentrace.

2. Zamíchat na vortexu, krátce centrifugovat.

4. Provést qPCR na přístroji pro qPCR za podmínek optimalizovaných pro konkrétní dvojici primerů. Běžné cyklovací parametry jsou:

Denaturace při 94°C, 1 min.

Připojení primerů při 55°C, 30 sec.

Extenze při 72°C, 30 sec.

Celkem 40 cyklů na cykleru pro real-time PCR.

SYTO-9 qPCR 2x Master Mix je mimořádně vhodný pro rutinní vyšetřování větších počtů vzorků cDNA.

K roztoku SYTO-9 qPCR 2x Master Mixu v originální zkumavce (0,5 ml) je možné přidat požadované primery (např. 2x 40 µl) a PCR H₂O (380 µl). Vlastní přípravu PCR lze pak omezit pouze na smíchání části této reakční směsi (např. 24 µl) s analyzovanou DNA (1 µl). Je výhodné rozplnit reakční mixy do 96-jamkových destiček pro real-time PCR a vlastní reakci provést na cyklerech pro 96-jamkové destičky.