

qPCR 2x Blue Master Mix

(katalogové číslo P521, P522, P523, P523xl)

rev. 02/2017

Popis produktu

Tento produkt představuje alternativu k qPCR 2x Master Mixu s jiným puřrem, který obsahuje síran amonný a v některých případech může sniřovat tvorbu nespecifických DNA produktů během PCR. Hlavní využití tohoto produktu je v qPCR s detekčními sondami typu TaqMan, Molecular beacons, FRET a další.

Rychlá příprava (2x koncentrovaný)

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

Hot Start

- Produkt obsahuje monoklonální protilátku anti-Taq, která se váže na 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

- Tento produkt je optimalizován pro citlivou a přesnou detekci DNA fragmentů amplifikovaných při qPCR z genomové DNA nebo cDNA získané metodou reverzní transkripce.

Technické údaje

Komponenty základního balení

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

Skladování

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

Složení

- Dodává se 2x koncentrovaný.
150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (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, Taq DNA polymerázy (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, stabilizátory a aditiva.

Kontrola kvality

- Každá šarže qPCR 2x Blue Master Mixu je testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Mnořství
P521	qPCR 2x Blue Master Mix (1x)	40 reakcí
P522	qPCR 2x Blue Master Mix (5x)	200 reakcí
P523	qPCR 2x Blue Master Mix (25x)	1000 reakcí
P523xl	qPCR 2x Blue Master Mix (100x)	4x 1000 reakcí



Protokol

Doporučený protokol pro přípravu vzorků pro amplifikaci DNA s využitím qPCR 2x Blue Master Mixu (příklad).

1. V tenkostěnných PCR mikrozkušavkách smíchat:

Reagens	Objem*	Finální koncentrace
qPCR 2x Blue Master Mix	12,5 µl	75 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 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 (19nM), 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
Sonda pro real-time detekci tvorby specifického produktu	1 µl	
PCR Ultra H ₂ O (kat. č. P040)	8,5 ul	do finálního objemu 25 µl

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

2. Zamíchat na vortexu, krátce centrifugovat.

4. Provést real-time PCR za podmínek optimalizovaných pro konkrétní dvojici primerů vymezující amplifikovaný úsek DNA (obvykle ~ 200 bp). Běžné cyklovací parametry jsou:

	Teplota	Doba	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94°C	5 min	1
Denaturace	94°C	10 s	30-45
Nasednutí primerů	55-65°C ¹	10 s	
Extenze	72°C	cca 20s 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.

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

K roztoku qPCR 2x Blue Master Mixu v originální zkumavce (0,5 ml) je možné přidat požadované primery (např. 2 x 40 µl), sondu (40 µl) a PCR H₂O (340 µl). Vlastní přípravu PCR lze pak omezit pouze na smíchání části této reakční směsi (např. 24 µl) s analyzovanou DNA (1 µl).