

## TP 2x Master Mix

(katalogové číslo T601, T602, T603, T603xl)

rev. 01/2022

### Popis

TP 2x Master Mix je určený pro univerzální analýzu vzorků pomocí metody PCR. Vychází z nedávného nálezu, že přidání Trehalózy a 1,2-Propandiolu (zkráceně **TP**) do reakční směsi může podstatně zvýšit účinnost PCR a napomoci při amplifikaci obtížně analyzovatelných vzorků, včetně DNA z neseparované krve, se zvýšeným obsahem GC a vzorků, které obsahují inhibitory PCR (*Horáková a spol., BMC Biotechnology, 11:41, 2011; Free PMC article*).

### Rychlá příprava vzorků

- Produkt obsahuje všechny konstantní komponenty pro PCR 2x koncentrované (optimalizovaný reakční pufr s přísadkou trehalózy a 1,2-propandiolu, nukleotidy a Q-Taq DNA polymerázu). To umožňuje rychlou přípravu reakční směsi bez nutnosti rozmrazování a přesného dávkování jednotlivých komponent. Stačí dodat primery, templátovou DNA a eventuálně doplnit H<sub>2</sub>O (součást balení).
- TP 2x Master Mix je mimořádně vhodný pro rutinní vyšetřování větších počtů vzorků DNA. K roztoku TP 2x Master Mixu v originální zkumavce (0,5 ml) je možné přidat požadované primery (např. 2 x 40 µl) a PCR H<sub>2</sub>O (např. 380 µl). Vlastní přípravu PCR lze pak omezit pouze na smíchání části této reakční směsi (např. 24 µl) s analyzovanou DNA popřípadě ředěnou krví (např. 1 µl).

### Technické údaje

#### Komponenty balení

- 1 zkumavka s 0,5 ml TP 2x Master Mixu (na 40 reakcí po 25 µl).
- 1 zkumavka s 1,5 ml PCR H<sub>2</sub>O.

#### Skladování

- Krátkodobě (hodiny, dny) při pokojové teplotě
- Krátkodobě (týdny) 4 - 8°C
- Dlouhodobě při -20°C ± 5°C.

#### Složení

- TP 2x Master Mix obsahuje: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4 M trehalóza, 2 M 1,2-propandiol, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, Q-Taq DNA polymeráza (50 U/ml), stabilizátory a aditiva.

#### Kontrola kvality

- Každá šarže TP 2x Master Mixu je testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA s vysokým obsahem GC.

Kat. č.	Název výrobku	Množství
T601	TP 2x Master Mix (1x)	40 reakcí
T602	TP 2x Master Mix (5x)	200 reakcí
T603	TP 2x Master Mix (25x)	1000 reakcí
T603xl	TP 2x Master Mix (100x)	4x 1000 reakcí



## **Protokol**

### **Doporučený protokol pro PCR s využitím TP 2x Master Mix (příklad)**

1. V tenkostěnných mikrokumavkách pro PCR smíchat:

	<b>PCR v 25 <math>\mu</math>l*</b>	<b>Výsledná koncentrace</b>
TP 2x Master Mix**	12,5 $\mu$ l	75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2 M trehalóza, 1 M 1,2-propandiol, 0,01% Tween 20, 2,5 mM $\text{MgCl}_2$ , 200 $\mu$ M každý dNTP, 25 U/ml Taq DNA polymeráza, stabilizátory a aditiva
5' primer (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	2 $\mu$ M
3' primer (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	2 $\mu$ M
Templátová DNA (1 ng/ $\mu$ l - 1 $\mu$ g/ $\mu$ l); popřípadě 2x ředěná celá krev	1 $\mu$ l	0,04 ng – 0,04 $\mu$ g DNA/ $\mu$ l
PCR Ultra H <sub>2</sub> O (kat. č. P040)	9,5 $\mu$ l	

\*Lze použít i jiné objemy, nutné je aby TP 2x 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 zahřátí Master Mixu na 37°C.

2. Krátce promíchat na vortexu, krátce centrifugovat.
3. Provést PCR za podmínek optimalizovaných pro konkrétní dvojici primerů. Běžné cyklovací parametry jsou:

I. Úvodní denaturace při 94°C, 10 min.

II. Vlastní amplifikace a detekce amplifikovaného fragmentu:

Denaturace	při 94°C, 10 s
Připojení primerů	při 55-65°C (v závislosti na vlastnostech primerů), 10 s
Extenze	při 72°C, 10-30 s (cca 20 s na 500 pb)
	Opakovat 30-45x

III. Analýza PCR amplikonů elektroforézou v agarózovém gelu.