

LA Hot Start Master Mix

(Katalogové číslo L608, L609, L610, L610xl)

rev. 01/2022

Popis produktu

Jedná se o optimalizovaný mix k univerzálnímu použití v PCR. Obsahuje směs dvou DNA polymeráz, deoxyribonukleotid trifosfáty (dNTP), barvivo, anti-Taq monoklonální protilátku, pufr, stabilizátory, aditiva a další komponenty. Tento produkt je nejpokročilejší varianta Master mixu.

Rychlá příprava, 500 µl alikvoty

- 2x koncentrovaný mix je alikvotovaný po 500 µl. To snižuje možnost kontaminace a umožňuje rychlou přípravu vzorků. Stačí dodat specifické oligonukleotidové primery, templátovou DNA a doplnit H₂O (součást balení).

LA (Long and Accurate)

- Mix obsahuje unikátní směs dvou DNA polymeráz. Jednou z nich je Taq DNA polymeráza, která je vysoce procesivní, ale postrádá 3'→5' exonukleázovou aktivitu a není schopna opravovat chyby v podobě nukleotidových záměn při syntéze komplementárního řetězce DNA. Druhá polymeráza je méně procesivní, ale vykazuje 3'→5' exonukleázovou aktivitu a tím snižuje množství chyb vzniklých při replikaci DNA. Kombinace těchto dvou polymeráz vede k výraznému snížení chyb při zachování vysoké robustnosti. To umožňuje amplifikaci úseků DNA do velikosti 15 kb (v případě komplexní genomové DNA) nebo až 40 kb (v případě virové DNA) s podstatně nižším výskytem mutací ve srovnání se samotnou Taq DNA polymerázou.

Hot Start

- Mix obsahuje monoklonální protilátku, která se váže na DNA polymerázy a tím blokuje jejich enzymatickou aktivitu a zamezuje amplifikaci nespecifických DNA fragmentů. Vazebná kapacita protilátky je zrušena při prvním denaturačním cyklu PCR, bez nutnosti jeho prodloužení.

Okamžité nanášení na gel

- K vzorkům po PCR není nutné přidávat vkladací pufr. Mix obsahuje barvivo a aditiva, která umožňují nanášení vzorku na gel a elektroforézu hned po ukončení PCR.
- Barvivo migruje v čele gelu a neinterferuje tak s kvantifikovatelností PCR produktů. Barvivo ani aditiva nemají vliv na průběh amplifikace.

Vysoká účinnost a citlivost

- Mix umožňuje velmi účinnou a specifickou amplifikaci požadovaných fragmentů DNA nebo cDNA; obsahuje MgCl₂ v koncentraci vhodné pro většinu reakcí.

Technické údaje

Komponenty základního balení

- 1 zkumavka s 0,5 ml LA Hot Start Master Mix (na 40 reakcí o objemu 25 µl).
- 1 zkumavka s 1,5 ml PCR H₂O.

Složení

- LA Hot Start Master Mix se dodává 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, 100 U/ml směsi DNA polymeráz, monoklonální protilátka anti-Taq (38 nM), barvivo, stabilizátory a aditiva.

Skladování

- Mix je skladován při teplotě -20°C ± 5°C; krátkodobě (do týdne) lze skladovat i při teplotě 4 - 30°C. To snižuje nároky na přepravu (Nature friendly). Materiál snáší opakované rozmrazování.

Čistota produktu a kontrola kvality

- Čistota polymeráz je ověřována elektroforeticky (SDS-PAGE). Preparát neobsahuje nukleázy.
- Každá šarže LA Hot Start Master Mixu je testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA.

Protokol

Doporučený protokol na přípravu vzorků pro amplifikaci DNA s využitím LA Hot Start Master Mix

1. V tenkostěnných PCR mikrozkuvkách smíchat:

Objem*	Reagens	Finální koncentrace
12,5 µl	LA Hot Start Master Mix	1x LA Hot Start Master Mix (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 dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 50 U/ml směs DNA polymeráz, 19 nM anti-Taq monoklonální protilátka)
1 µl	5' primer	0,1 - 1 µM (~ 20 bází)
1 µl	3' primer	0,1 - 1 µM (~ 20 bází)
1 µl	templátová DNA	
9,5 µl	PCR H ₂ O	

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

2. Zamíchat na vortexu, krátce centrifugovat.

3. Přidat ~20 µl PCR oleje (kat. č. P043) pro omezení vypařování (není nutné při použití cyklerů s vyhříváním 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 *	15 s	
Extenze	72°C	1 min na 1 kb	
Finální extenze	72°C	7 min	1
Chlazení	22°C		

* 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 nutnosti přidávat nanášecí pufr.

LA Hot Start Master Mix je mimořádně vhodný pro rutinní vyšetřování větších počtů vzorků DNA.

K roztoku Master Mixu v originální zkuvkavce (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).

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
L608	LA Hot Start Master Mix (1x)	40 reakcí
L609	LA Hot Start Master Mix (5x)	200 reakcí
L610	LA Hot Start Master Mix (25x)	1000 reakcí
L610xl	LA Hot Start Master Mix (100x)	4x 1000 reakcí

