

qPCR Visible Blue Mark

(katalogové číslo B129)

rev. 11/2022

Popis produktu

qPCR Visible Blue Mark je barvivo zvyšující viditelnost reakčních směsí pro PCR a tím umožňuje pracovat s větší rychlostí a přesností při manipulaci s malými objemy reagensů ve zkumavkách, stripech nebo více-jamkových destičkách (viz Obr. 1). Přítomnost barviva je zvláště výhodná pro genotypizaci jednonukleotidových polymorfismů (SNP) a vysoce výkonnou analýzu genové exprese s využitím více-jamkových destiček. Přítomnost barviva, pokud se používá podle návodu, neovlivňuje účinnost PCR, neinterferuje s široce používanými fluorescenčními barvivy pro qPCR, jako jsou SYBR Green, EvaGreen nebo detekcí na bázi sond. qPCR Visible Blue Mark je optimalizován pro různé Master Mixy Top-Bio provenience, včetně Master Mixů pro PCR s horkým startem. qPCR Visible Blue Mark je kompatibilní s řadou přístrojů pro PCR v reálném čase. S výhodou lze qPCR Visible Blue Mark přidávat přímo do master mixů nebo jej použít jako součást komponent PCR přidávaných ve vybraném kroku.

Technické údaje

Komponenty základního balení

- 1 zkumavka se 100 µl 200x koncentrovaného barviva qPCR Visible Blue Mark umožňuje připravit 1000 PCR reakčních směsí po 20 µl.

Skladování

- Barvivo lze skladovat ve tmě při teplotě $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ po dobu do 12 měsíců; při teplotě $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ po dobu do 1 měsíce. Transport je realizován obvykle při pokojové teplotě.

Složení

qPCR Visible Blue Mark je 200x koncentrované netoxické modré barvivo v 75 mM Tris-HCl, pH 8,0 (při 25°C), doplněné stabilizátory a aditivy.

Kontrola kvality

- Každá šarže produktu je testována v qPCR s použitím fluorescenčního barviva SYBR Green I. V přítomnosti barviva není pozorován žádný rozdíl v účinnosti qPCR. Typický výsledek takového testování je uveden v Obr. 2.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
B129	qPCR Visible Blue Mark	100 µl



Protokol

Následující protokol je vodítkem a měl by být optimalizován podle konkrétních aplikací. V konečné reakční směsi pro qPCR musí být qPCR Visible Blue Mark ředěn 200x.

A. Přidání barviva qPCR Visible Blue Mark do Master Mixu pro qPCR

1. Rozmrazit 200x koncentrované barvivo qPCR Visible Blue Mark a Master mix (např. qPCR 2x Blue Master mix, 500 µl; Top-Bio, kat. č. P521) při pokojové teplotě.
2. Důkladně promíchat a krátce centrifugovat. Poté zkumavky uchovávat na ledu a chráněné před světlem.
3. Do 500 µl 2x koncentrovaného Master mixu přidat 5 µl barviva qPCR Visible Blue Mark.
4. Důkladně promíchat a krátce centrifugovat. Zkumavky dále uchovávat na ledu, chráněné před světlem.
5. Pro 20 µl PCR reakci napipetovat 10 µl qPCR master mix do vícejamkových destiček, stripů nebo zkumavek a poté 10 µl zbývajících komponent (DNA, primery, sondy). Při vkládání do průhledných zkumavek nebo destiček je vhodné pro lepší viditelnost umístit materiály na bílé pozadí.

B. Přidání barviva qPCR Visible Blue Mark do vzorku testované DNA

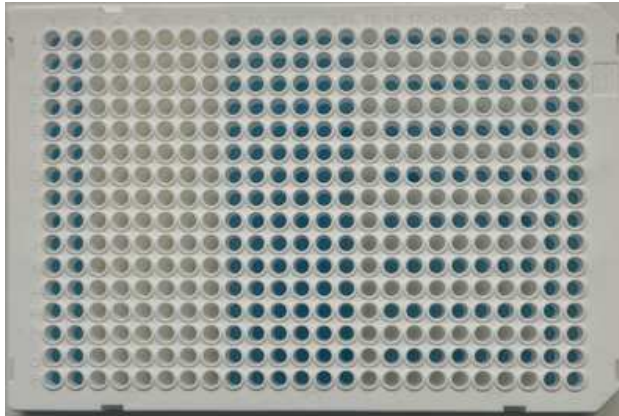
Barvivo lze přidat ke vzorku DNA pro sledování přidání templátové DNA nebo cDNA do jamek.

1. Rozmrazit při pokojové teplotě 200x koncentrovaný qPCR Visible Blue Mark a vzorky s DNA.
2. Důkladně promíchat qPCR Visible Blue Mark a zkumavku krátce centrifugovat. Zkumavku uchovávat na ledu, chráněné před světlem.
3. Napipetovat příslušné množství qPCR Visible Blue Mark do zkumavky s DNA. Nutno vzít do úvahy, že Blue Mark musí být v konečné PCR směsi naředěn 200x. Viz příklady v tabulce 1.

Tabulka 1. *Příklad objemů (v µl) pro přidání qPCR Visible Blue Mark do vzorků s templátovou DNA*

Konečný objem PCR	Objem templátové DNA do PCR	Vzorek DNA Objem	200x qPCR Visible Blue Mark Objem do vzorku DNA
20	4	100	2.5
20	2	20	1
10	2	100	2.5
10	1	20	1

Obr. 1. qPCR Visible Blue Mark usnadňuje pipetování do multi-jamkových destiček. Do jamek 384-jamkové destičky byly vpraveny 10 μ l alikvoty qPCR 2xSYBR Master Mix (sloupce 3-8) nebo 10 μ l alikvoty qPCR 2x SYBR Master Mix_BLUE, obsahující 100x ředěný qPCR Visible Blue Mark (sloupce 1, 2, 9-14, 23, 24). Ve sloupci 16-22 byl qPCR 2xSYBR Master Mix_BLUE napipetován jen do řádek A, C, E, G, I, K, M a O. Ve sloupci 15 zůstaly všechny jamky prázdné.



Obr. 2. qPCR Visible Blue Mark neovlivňuje účinnost qPCR. qPCR 2x Blue Master Mix (Top-Bio, kat. č. P521) byl doplněn (modré křivky) nebo ne (zelené křivky) o qPCR Visible Blue Mark (konečné ředění 1:200), SYBR Green 1, DNA templát v pěti desetinásobných ředěních a odpovídající primery. Do testu byla také zahrnuta kontrola bez DNA templátu (NTC). Vzorky ve trojicích byly analyzovány pomocí cykleru pro real-time PCR.

