

qPCR 2x Blue Master Mix_BLUE

(katalogové číslo B621, B622, B623, B623xl)

rev. 11/2022

Popis produktu

Tento produkt je qPCR 2x Blue Master Mix, obohacený o barvivo qPCR Visible Blue Mark Top-Bio preventionce (kat. č. B129). Přítomnost barviva neovlivňuje průběh PCR, ale usnadňuje vizualizaci přítomnosti Master mixů ve více-jamkových destičkách. 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 pufr, 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_BLUE (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, barvivo qPCR Visible Blue Mark, stabilizátory a aditiva.

Kontrola kvality

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

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
B621	qPCR 2x Blue Master Mix_BLUE (1x)	40 reakcí
B622	qPCR 2x Blue Master Mix_BLUE (5x)	200 reakcí
B623	qPCR 2x Blue Master Mix_BLUE (25x)	1000 reakcí
B623xl	qPCR 2x Blue Master Mix_BLUE (100x)	4x 1000 reakcí



Protokol

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

1. V tenkostěnných PCR mikrozkušavkách smíchat:

Reagens	Objem*	Finální koncentrace
qPCR 2x Blue Master Mix_BLUE	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), qPCR Visible BLUE Dye, 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_BLUE naředěn 2x a aby byly dodrženy finální koncentrace komponent.

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_BLUE je mimořádně vhodný pro rutinní vyšetřování větších počtů vzorků cDNA.

K roztoku qPCR 2x Blue Master Mixu_BLUE 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). Přítomnost modrého barviva qPCR Visible Blue Mark usnadňuje orientaci o jamkách s tímto PCR Master Mixem v multijamkových destičkách.