

Plain PP Master Mix

(katalogové číslo P201, P202, P203. P203xl)

rev. 01/2022

Popis produktu

Plain PP Master Mix představuje doplňkový produkt z řady PPP Master Mixů. Oproti klasickému PPP Master Mixu (kat. č. P124-P126) však **neobsahuje barvivo**. To je vhodné pro aplikace, kde by mohlo barvivo vadit; jako příklad lze uvést analýzu pomocí kapilární chromatografie. Tento produkt obsahuje Taq DNA polymerázu a optimalizovaný reakční pufr, vše ve dvojnásobné koncentraci. Pro přípravu vzorku tedy stačí dodat primery, templátovou DNA a vodu a poté je možné zahájit PCR reakci. Plain PP Master Mix navíc obsahuje aditiva, která umožňují po přidání požadovaného barviva nanést vzorky rovnou na gel a spustit elektroforézu.

Rychlá příprava (2x koncentrovaný)

- Kit obsahuje 2x koncentrované komponenty nezbytné pro průběh PCR reakce. To umožňuje rychlou přípravu reakční směsi bez nutnosti rozmrazování jednotlivých komponent. Stačí dodat primery, templátovou DNA a doplnit H₂O (součást balení).

Optimalizovaný reakční pufr

- Obsahuje reakční pufr, který zvyšuje účinnost i specifitu PCR; obsahuje MgCl₂ v koncentraci vhodné pro většinu PCR reakcí.
- Obsahuje stabilizátory, které umožňují krátkodobé skladování při 4°C.

Jednoduché nanášení na gel

- Obsahuje aditiva, která umožňují nanést vzorky na gel bez nutnosti přidávat vkladací pufr. V případě potřeby tedy stačí k vzorku přidat barvivo, a vzorky posléze analyzovat pomocí elektroforézy.

Technické údaje

Komponenty základního balení

- 1 zkumavka s 0,5 ml Plain PP Master Mixu (na 40 reakcí v celkovém objemu 25μl).
- 1 zkumavka s 1,5 ml PCR H₂O.

Složení

- Plain PP Master Mix se dodává 2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (při 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 Taq DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva.

Skladování

- Krátkodobě (dny) skladovat při teplotě 4°C ± 3°C.
- Dlouhodobě skladovat při teplotě -20°C ± 5°C. Materiál snáší opakované rozmrazování.

Čistota produktu a kontrola kvality

- Čistota Taq polymerázy je ověřena metodou SDS PAGE, kdy enzym migruje jako jediný proužek o molekulové hmotnosti 94 kD. Preparát neobsahuje nukleázy.
- Každá šarže Plain PP Master Mixu je testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
P201	Plain PP Master Mix (1x)	40 reakcí
P202	Plain PP Master Mix (5x)	200 reakcí
P203	Plain PP Master Mix (25x)	1000 reakcí
P203xl	Plain PP Master Mix (100x)	4x 1000 reakcí



Protokol

Doporučený protokol na přípravu vzorků pro PCR s využitím Plain PP Master Mixu

1. V tenkostěnných PCR mikrozkuvkách smíchat:

Objem*	Reagens	Finální koncentrace
12,5 µl	Plain PP Master Mix	1x Plain PP 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, 1,25 U Taq DNA polymeráza, stabilizátory a aditiva)
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	do finálního objemu 25 µl

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

2. Zamíchat na vortexu, krátce centrifugovat.

3. Přidat ~ 20 µl PCR oleje (kat. č. P043) pro omezení vypařování (není nutné při použití cyklerů s vyhřívaným 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 ¹	15 s	
Extenze	72°C	1 min 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.

Protokol pro tzv. „Hot start“ PCR (pro snížení amplifikace nežádoucích fragmentů)

1. V tenkostěnných PCR mikrozkuvkách smíchat:

- 1 µl 5' primeru
- 1 µl 3' primeru
- 1 µl templátové DNA
- 9,5 µl PCR H₂O.

2. Zamíchat na vortexu, krátce centrifugovat.

3. Zahřát na 94°C po dobu 1 min (denaturace).

4. Přidat 12,5 µl Plain PP Master Mix, zamíchat.

5. Přidat ~ 20 µl PCR oleje pro omezení vypařování (není nutné při použití cyklerů s vyhřívaným víčkem).

6. Provést PCR reakci a analýzu vzorků jak je popsáno výše.