

Plain Combi PP Master Mix

(katalogové číslo C211, C212, C213, C213xl)

rev. 01/2022

Popis produktu

Plain Combi PP Master Mix představuje modifikaci Combi PPP Master Mixu (kat. č. C208-C210), protože **neobsahuje barvivo**. To je vhodné pro aplikace, kde by mohlo barvivo vadit; jako příklad lze uvést analýzu pomocí kapilární chromatografie.

Combi PPP Master Mix obsahuje Taq DNA polymerázu a další komponenty nezbytné pro úspěšný průběh PCR reakce ve dvojnásobné koncentraci. Stačí tedy pouze doplnit primery, templátovou DNA a vodu a vzorek je připraven k PCR. Plain Combi PP Master Mix navíc obsahuje aditiva, která umožňují po přidání požadovaného barviva nanést vzorky rovnou na gel a spustit elektroforézu.

Hot Start

- Plain Combi PP Master Mix obsahuje monoklonální protilátku, která se váže na Taq DNA polymerázu, tím blokuje její enzymatickou aktivitu a zamezuje amplifikaci nesespecifických DNA fragmentů. Protilátka je teplotně inaktivována při prvním denaturačním cyklu PCR.

Rychlá příprava (2x koncentrovaný)

- 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).

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.

Vysoká účinnost a citlivost

- Kit umožňuje velmi citlivou a specifickou amplifikaci požadovaných PCR fragmentů z genomické DNA nebo z komplementární cDNA získané metodou reverzní transkripce; obsahuje MgCl₂ v koncentraci vhodné pro většinu PCR reakcí.
- Přidaná monoklonální protilátka výrazně snižuje tvorbu nesespecifických produktů.

Technické údaje

Komponenty základního balení

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

Složení

- Plain Combi PP 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 Taq DNA polymerázy, monoklonální protilátka anti-Taq (38 nM), stabilizátory a aditiva.

Skladování

- Skladovat při teplotě -20°C ± 5°C; materiál snáší opakované rozmrazování.

Čistota produktu a kontrola kvality

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

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
C211	Plain Combi PP Master Mix (1x)	40 reakcí
C212	Plain Combi PP Master Mix (5x)	200 reakcí
C213	Plain Combi PP Master Mix (25x)	1000 reakcí
C213xl	Plain Combi PP Master Mix (100x)	4x 1000 reakcí



Protokol

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

1. V tenkostěnných PCR mikrozkušnicích smíchat:

Objem*	Reagens	Finální koncentrace
12,5 µl	Plain Combi PP M. 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, anti-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 Combi PP Master Mix naředěn 2x a aby byly dodrženy finální koncentrace. Barvivo je možno přidat v objemu do 9,5 µl a odpovídajícím způsobem redukovat objem H₂O.

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.

Plain Combi PP Master Mix je mimořádně vhodný pro rutinní analýzu produktů PCR pomocí automatických detektorů (kapilární chromatografie, "real-time PCR" a další). K Plain Combi PP Master Mixu v originální zkumavce (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).