

qPCR 2x SYBR Master Mix

(katalogové číslo P551, P552, P553, P553xl)

rev. 01/2022

Popis produktu

qPCR 2x SYBR Master Mix je určený pro analýzu vzorků pomocí metody qPCR s kvantifikací amplifikovaných DNA fragmentů pomocí fluorescenčního DNA barviva SYBR Green I.

SYBR Green I

- Produkt obsahuje interkalační DNA barvivo SYBR Green I, které se po navázání na dvouvláknovou DNA stává silně fluorescenční s maximální excitací 497 nm (modré světlo) a emisí 520 nm (zelené světlo). Protože fluorescence SYBR Green I nenavázaného na DNA je velmi nízká, je nárůst fluorescence vzorku na konci elongační fáze PCR reakce přímo úměrný množství amplifikovaných fragmentů.

Rychlá příprava (2x koncentrovaný)

- Produkt obsahuje všechny konstantní komponenty pro qPCR 2x koncentrované (optimalizovaný reakční pufr, nukleotidy, Taq DNA polymerázu, protilátku anti-Taq, SYBR Green I). To umožňuje rychlou přípravu reakční směsi bez nutnosti rozmrazování a přesného dávkování jednotlivých komponent. Stačí dodat primery, templátovou DNA a eventuálně doplnit H₂O (součást balení).

Hot Start

- Produkt obsahuje monoklonální protilátku anti-Taq, která se váže na Taq DNA polymerázu a tím blokuje její enzymatickou aktivitu a zamezuje amplifikaci nespecifických DNA fragmentů. Protilátka je teplotně inaktivována při prvním denaturačním cyklu qPCR.

Citlivá detekce

- Tento produkt je optimalizován pro citlivou a přesnou detekci DNA fragmentů amplifikovaných při qPCR z genomové DNA nebo z cDNA, získané metodou reverzní transkripce.

Technické údaje

Komponenty balení

- 1 zkumavka s 0,5 ml qPCR 2x SYBR Master Mixu (toto množství je dostačující např. na 40 reakcí po 25 µl).
- 1 zkumavka 1,5 ml PCR H₂O.

Skladování

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

Složení

- Dodává se 2x koncentrovaný.
20 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 100mM KCl, 0,2% Triton X-100, 3 mM MgCl₂, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYBR Green I, stabilizátory a aditiva.

Kontrola kvality

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

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
P551	qPCR 2x SYBR Master Mix (1x)	40 reakcí
P552	qPCR 2x SYBR Master Mix (5x)	200 reakcí
P553	qPCR 2x SYBR Master Mix (25x)	1000 reakcí
P553xl	qPCR 2x SYBR Master Mix (100x)	4x 1000 reakcí



Protokol

Doporučený protokol pro přípravu vzorků pro amplifikaci DNA s využitím qPCR 2x SYBR Master Mixu (příklad)

1. V tenkostěnných PCR mikrozkušavkách smíchat:

Reagens	Objem*	Finální koncentrace
qPCR 2x SYBR Master Mix	12,5 µl	10 mM Tris-HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl ₂ , 200 µM každý dNTP, 25 U/ml Taq DNA polymeráza, monoklonální protilátka anti-Taq, SYBR Green, 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
PCR H ₂ O (kat. č. P042)	9,5 ul	do finálního objemu 25 µl

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

2. Zamíchat na vortexu, krátce centrifugovat.
3. Provést kvantitativní PCR za podmínek optimalizovaných pro konkrétní dvojici primerů. Běžné cyklovací parametry jsou:
- I. Úvodní denaturace 94°C, 5 min.
 - II. Vlastní amplifikace a detekce amplifikovaného fragmentu:
 - Denaturace 94°C, 10s
 - Připojení primerů při 55-65°C (v závislosti na páru primerů), 10 s
 - Extenze při 72°C, 10-30 s (cca 20s na 500 pb)
 - Během této fáze je analyzována fluorescence SYBR
 - Opakovat 30-45x.
 - III. High resolution melting (HRM) analýza
 - 94°C, 10 s
 - 65°C, 1 min
 - Kontinuálně zvyšovat teplotu z 65°C na 94°C a snímat fluorescenci SYBR Green I.

qPCR 2x SYBR Master Mix je mimořádně vhodný pro rutinní vyšetřování větších počtů vzorků cDNA. K roztoku qPCR 2x SYBR 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).