

TP SYBR 2x Master Mix

(katalogové číslo T605, T606, T607, T607xl)

rev. 02/2022

Popis

TP SYBR 2x Master Mix je určený pro univerzální analýzu vzorků pomocí metody qPCR s kvantifikací amplifikovaných DNA fragmentů pomocí fluorescenčního DNA barviva SYBR Green I. Vychází z nedávného nálezu, že přidání Trehalózy a 1,2-Propandiolu (zkráceně TP) do reakční směsi může podstatně zvýšit účinnost PCR a napomoci při amplifikaci obtížně analyzovatelných vzorků, včetně DNA z neseparované krve, se zvýšeným obsahem GC a vzorků, které obsahují inhibitory PCR (*Horáková a spol., BMC Biotechnology, 11:41, 2011*).

SYBR green I

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

Rychlá příprava

- Produkt obsahuje všechny konstantní komponenty pro qPCR 2x koncentrované (optimalizovaný reakční pufr s přídavkem trehalózy a 1,2-propanediolu, nukleotidy, Taq DNA polymerázu, 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).
- TP SYBR 2x Master Mix je mimořádně vhodný pro rutinní vyšetřování větších počtů vzorků DNA. K roztoku TP SYBR 2x Master Mixu v originální zkumavce (0,5 ml) je možné přidat požadované primery (např. 2 x 40 µl) a PCR H₂O (např. 380 µl). Vlastní přípravu PCR lze pak omezit pouze na smíchání části této reakční směsi (např. 24 µl) s analyzovanou DNA popřípadě ředěnou krví (např. 1 µl).

Technické údaje

Komponenty balení

- 1 zkumavka s 0,5 ml TP SYBR 2x Master Mixu (na 40 reakcí po 25 µl).
- 1 zkumavka s 1,5 ml PCR Ultra H₂O.

Skladování

- Krátkodobě (hodiny, dny) při pokojové teplotě
- Krátkodobě (týdny) 4 - 8°C
- Dlouhodobě při -20°C ± 5°C.

Složení

- TP SYBR 2x Master Mix obsahuje: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,4 M trehalóza, 2 M 1,2-propandiol, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), SYBR Green I, stabilizátory a aditiva.

Kontrola kvality

- Každá šarže TP SYBR 2x Master Mixu je testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA s vysokým obsahem GC.

Kat. č.	Název výrobku	Množství
T605	TP SYBR 2x Master Mix (1x)	40 reakcí
T606	TP SYBR 2x Master Mix (5x)	200 reakcí
T607	TP SYBR 2x Master Mix (25x)	1000 reakcí
T607xl	TP SYBR 2x Master Mix (100x)	4x 1000 reakcí



Protokol

Doporučený protokol pro PCR s využitím TP SYBR 2x Master Mix (příklad)

1. V tenkostěnných mikrozkuvkách pro PCR smíchat:

	PCR v 25 μ l*	Výsledná koncentrace
TP SYBR 2x Master Mix**	12,5 μ l	75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 M trehalóza, 1 M 1,2 propandiol, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl_2 , 200 μ M každý dNTP, 25 U/ml Taq DNA polymeráza, SYBR Green I, stabilizátory a aditiva
5' primer (50 μ M)	1 μ l	2 μ M
3' primer (50 μ M)	1 μ l	2 μ M
Templátová DNA (1 ng/ μ l - 1 μ g/ μ l); popřípadě neseparovaná 2x ředěná krev	1 μ l	0,04 ng – 0,04 μ g DNA/ μ l
PCR Ultra H ₂ O (kat. č. P040)	9,5 μ l	

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

**Před použitím zamraženého Mixu je nutné aby všechny jeho komponenty byly dokonale rozpuštěny a promíchány. Urychlenému rozpuštění komponent napomáhá zahřátí Master Mixu na 37°C.

2. Krátce zamíchat na vortexu, krátce centrifugovat.
3. Provést kvantitativní PCR za podmínek optimalizovaných pro konkrétní dvojici primerů. Běžné cyklovací parametry jsou:
- I. Úvodní denaturace při 94°C, 10 min.
 - II. Vlastní amplifikace a detekce amplifikovaného fragmentu:
 - Denaturace při 94°C, 10 s
 - Připojení primerů při 55-65°C (v závislosti na vlastnostech primerů), 10 s
 - Extenze při 72°C, 10-30 s (cca 20 s na 500 pb)*
 - *během této fáze je měřena fluorescence SYBR Green IOpakovat 30-45x
 - III. HRM (high resolution melting) analýza
 - Denaturace 94°C, 10 s
 - Hybridizace 65°C, 1 min
 - Kontinuálně zvyšovat teplotu na 94°C a měřit fluorescenci.