

## TP HS DNA-free 2x Master Mix

(katalogové číslo T621, T622, T623)

rev. 01/2022

### Popis

TP HS DNA-free 2x Master Mix je určen pro univerzální analýzu vzorků pomocí metody PCR nebo qPCR se specifickými sondami typu TaqMan, Molecular beacons a FRET. Tento Master Mix není kontaminován bakteriální a kvasinkovou DNA a je proto zvláště vhodný pro genotypizaci bakterií a kvasinek. Master Mix obsahuje anti-Taq monoklonální protilátku pro hot-start (HS) PCR. Obsahuje rovněž trehalózu a 1,2-propandiol (TP) a tím umožňuje analýzu obtížně amplifikovatelných vzorků, včetně DNA se zvýšeným obsahem GC a vzorků, které obsahují inhibitory PCR (Horáková a spol., BMC Biotechnology, 11:41, 2011).

### Rychlá příprava vzorků

- Produkt obsahuje všechny konstantní komponenty PCR 2x koncentrované (optimalizovaný reakční pufr s přísadkou trehalózy a 1,2-propandiolu, nukleotidy, DNA-free Taq DNA polymerázu a anti-Taq monoklonální protilátku). To umožňuje rychlou přípravu reakční směsi bez nutnosti rozmrazování a přesného dávkování jednotlivých komponent. Stačí dodat primery, templátovou DNA a doplnit H<sub>2</sub>O (součást balení).
- TP HS DNA-free 2x Master Mix obsahuje anti-Taq monoklonální protilátku, která se váže na Taq DNA polymerázu a inhibuje její enzymatickou aktivitu. To umožňuje přípravu vzorků při pokojové teplotě. Hot-start na bázi anti-Taq protilátky nevyžaduje prodloužený inkubační krok pro aktivaci enzymu.
- TP HS DNA-free 2x Master Mix je mimořádně vhodný pro rutinní vyšetřování větších počtů vzorků DNA. K roztoku Master Mixu v originální zkumavce (0,5 ml) je možné přidat požadované primery (např. 2 x 40 µl) a PCR H<sub>2</sub>O (380 µl). Získaný „armed“ Master Mix může být skladován při -20°C. Bezprostředně před použitím je „armed“ Master Mix rozmražen a vlastní příprava PCR je omezena na smíchání části této reakční směsi (např. 24 µl) s analyzovanou DNA (např. 1 µl).

### Technické údaje

#### Komponenty a balení

- 1 zkumavka s 0,5 ml TP HS DNA-free 2x Master Mixu (na 40 reakcí po 25 µl).
- 1 zkumavka s 1,5 ml PCR Ultra H<sub>2</sub>O.

#### Skladování

- Krátkodobě (dny) při 2°C - 8°C.
- Dlouhodobě (týdny a měsíce) při -20°C ± 5°C.

#### Složení

- TP HS DNA-free 2x Master Mix obsahuje: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4 M trehalóza, 2 M 1,2-propandiol, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, DNA-free Taq DNA polymeráza (50 U/ml), anti-Taq monoklonální protilátka, stabilizátory a aditiva.

#### Kontrola kvality

- Každá šarže TP HS DNA-free 2x Master Mixu je testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA s vysokým obsahem GC a pro absenci bakteriální DNA. Ve vzorcích s primery pro bakteriální DNA, ale bez externě dodané templátové DNA nejsou detegovány žádné amplikony po 40 cyklech amplifikace.

Kat. č.	Název výrobku	Množství
T621	TP HS DNA-free 2x Master Mix	40 reakcí
T622	TP HS DNA-free 2x Master Mix	200 reakcí
T623	TP HS DNA-free 2x Master Mix	1000 reakcí



## **Protokol**

Doporučený protokol pro PCR s využitím TP HS DNA-free 2x Master Mix (příklad)

Při amplifikaci bakteriální a kvasinkové DNA je nutno pracovat za sterilních podmínek aby nedošlo ke kontaminaci vzorku.

1. V tenkostěnných mikrozkuvkách pro PCR smíchat:

	<b>PCR v 25 µl*</b>	<b>Výsledná koncentrace</b>
TP HS DNA-free 2x Master Mix**	12,5 µl	75 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 20 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,2 M trehalóza, 1 M 1,2-propandiol, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 200 µM každý dNTP, 25 U/ml DNA-free Taq DNA polymeráza, anti-Taq monoklonální protilátka, stabilizátory a aditiva
5' primer (50 µM)	0,5 µl	1 µM
3' primer (50 µM)	0,5 µl	1 µM
Templátová DNA (1 ng/µl - 1 µg/µl); popřípadě krev 2x ředěná PCR H <sub>2</sub> O	1 µl	0,04 ng – 0,04 µg DNA/µl
PCR Ultra H <sub>2</sub> O (kat. č. P040)	10,5 µl	

\*Lze použít i jiné objemy, jen je nutné aby TP HS DNA-free 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 krátké zahřátí Master Mixu na 37°C a zamíchání na vortexu.

2. Krátce zamíchat na vortexu a krátce centrifugovat.

3. Provést PCR za podmínek optimalizovaných pro konkrétní dvojici primerů. Běžné cyklovací parametry jsou:

	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklů</b>
Počáteční denaturace	94°C	2 min	1
Denaturace	94°C	15 s	25-35
Nasedání primerů	55-65°C	15 s	
Extenze	72°C	1 min na 1 kb	
Finální extenze	72°C	7 min	1
Ochlazení	22°C		

3. Amplifikovaná DNA může být smíchána s vkladacím pufrém (Kat. č. P048, P064 nebo P066) a vpravena do agarózového gelu pro elektroforetickou analýzu.