

qPCR 2x SYBR Master Mix_BLUE

(katalogové číslo B651, B652, B653, B653xl)

rev. 11/2022

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. Tento Master mix obsahuje navíc modré barvivo, které umožňuje snadnější sledování přítomnosti Master Mixu v jamkách destiček a přítom nemá vliv na qPCR.

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 cyklu přímo úměrný množství amplifikovaných fragmentů.

Vizualizační modré barvivo

- Produkt obsahuje barvivo qPCR Visible Blue Mark firmy Top-Bio (Kat. č. B129), které zvyšuje vizibilitu přítomnosti Master mixu v reakčních jamkách; tím usnadňuje pipetování a sledování distribuce reakčních směsí v jamkách destiček.

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.

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 a barvivo qPCR Visible Blue Mark). 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).

Citlivá detekce

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

Technické údaje

Komponenty balení

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

Složení

- Dodává se 2x koncentrovaný: 20 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 100 mM 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, qPCR Visible Blue Mark, stabilizátory a aditiva.

Skladování

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

Kontrola kvality

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

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
B651	qPCR 2x SYBR Master Mix_BLUE (1x)	40 reakcí
B652	qPCR 2x SYBR Master Mix_BLUE (5x)	200 reakcí
B653	qPCR 2x SYBR Master Mix_BLUE (25x)	1000 reakcí
B653xl	qPCR 2x SYBR Master Mix_BLUE (100x)	4x 1000 reakcí



Protokol

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

1. V tenkostěnných PCR mikrozkuvkách nebo jamkách destičky smíchat:

Reagens	Objem*	Finální koncentrace
qPCR 2x SYBR Master Mix_BLUE	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 z dNTP, 25 U/ml Taq DNA polymeráza, monoklonální protilátka anti-Taq, SYBR Green, qPCR Visible Blue Mark, 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_BLUE 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. HRM (High resolution melting) analýza
 - Denaturace 94°C, 10 s
 - Hybridizace 65°C, 1 min
 - Kontinuálně zvyšovat teplotu z 65°C na 94°C s měřením fluorescence SYBR Green I.