

## Aptamer Hot Start Master Mix

(Katalogové číslo A613, A614, A615, A615xl)

rev. 01/2022

### Popis produktu

Aptamer Hot Start Master Mix je optimalizovaná směs pro přímé použití v PCR. Směs obsahuje Taq DNA polymerázu, DNA aptamer anti-Taq, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, barvivo, stabilizátory a aditiva. Aditiva a barvivo umožňují přímé nanesení vzorku na gel bez nutnosti přidávat vkladací pufr. Při srovnání s hot start master mixy obsahující anti-Taq monoklonální protilátku, master mixy s anti-Taq aptamerem mají výhodu spočívající v: **(1)** zvýšené rezistenci k vyšším teplotám, **(2)** reverzibilnímu účinku na Taq polymerázu a **(3)** zvýšené chemické definovanosti Master Mixu. Master Mix není vhodný pro aplikace, které využívají fluorescenční DNA sondy pro detekci množství amplifikované DNA (qPCR). Je vhodný pro rutinní amplifikace DNA fragmentů do velikosti 5 kb. Master mix je kompatibilní s templátovou DNA získanou pomocí DEP-25 DNA extraction kitu (Kat. č. D225 – D227).

### **Hot Start**

- Aptamer Hot Start Master Mix obsahuje DNA aptamer anti-Taq, který reverzibilně váže Taq DNA polymerázu a tím inhibuje její enzymatickou aktivitu při teplotě nižší než 45°C. V průběhu PCR se aptamer uvolní a dochází k obnově aktivity enzymu. Tyto vlastnosti aptameru usnadňují přípravu reakční směsi pro PCR za pokojové teploty. Hot start PCR s využitím aptameru nevyžaduje prodlouženou inkubaci za denaturační teploty. Po skončení PCR se aptamer při nižší teplotě opět naváže na Taq DNA polymerázu a tím zablokuje její enzymatickou aktivitu.

### **Rychlá příprava**

- Všechny komponenty Aptamer Hot Start Master Mixu jsou 2x koncentrované. To umožňuje rychlou přípravu reakční směsi bez nutnosti rozmrazování jednotlivých komponent. Stačí dodat primery, templátovou DNA a doplnit H<sub>2</sub>O (součást balení).
- Hot Start 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. 2x 40 µl) a PCR Ultra H<sub>2</sub>O (380 µl). Vlastní přípravu PCR lze pak omezit pouze na smíchání části této reakční směsi (např. 24 µl) s analyzovanou DNA (1 µl).

### **Přímé nanášení na gel**

- Aptamer Hot Start Master Mix obsahuje aditiva a barvivo která umožňují po PCR vložení vzorku do gelu bez nutnosti přidat vkladací pufr.
- Barvivo migruje v čele gelu a neinterferuje s kvantifikovatelností PCR produktů. Aptamer, barvivo ani aditiva nemají negativní vliv na průběh amplifikace.

### **Vysoká účinnost a citlivost**

- Master Mix umožňuje velmi citlivou a specifickou amplifikaci požadovaných fragmentů DNA z genomové DNA nebo z cDNA získané metodou reverzní transkripce. Mix obsahuje MgCl<sub>2</sub> v koncentraci vhodné pro většinu PCR.
- DNA aptamer anti-Taq výrazně snižuje tvorbu nespecifických produktů.

## Technické údaje

### **Komponenty základního balení**

- 1 zkumavka s 0,5 ml Aptamer Hot Start Master Mixu (na 40 reakcí v celkovém objemu 25 µl).
- 1 zkumavka s 1,5 ml PCR H<sub>2</sub>O.

### **Složení**

- Aptamer Hot Start Master Mix se dodává 2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, DNA aptamer anti-Taq, barvivo, stabilizátory a aditiva.

### **Skladování**

- Skladovat při teplotě -20°C ± 5°C; Master mix snáší opakované rozmrazování. Master mix snáší krátkodobé (do 3 dnů) skladování při teplotě do 30°C. To usnadňuje jeho transport („nature friendly“).

## Čistota produktu a kontrola kvality

- Čistota Taq DNA polymerázy je ověřena metodou SDS PAGE: enzym migruje jako jediný proužek o molekulové hmotnosti 94 kD. Preparát neobsahuje nukleázy.
- Každá šarže Aptamer Hot Start Master Mixu je testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA.

## Protokol

### Doporučený protokol pro amplifikaci DNA s využitím Aptamer Hot-Start Master Mixu

1. V tenkostěnných PCR mikrozkušavkách smíchat:

Objem*	Reagens	Finální koncentrace
12,5 µl	Aptamer Hot Start Master Mix	1x Aptamer Hot Start Master Mix (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 50 U/ml Taq DNA polymerázy, aptamer anti-Taq 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 <sub>2</sub> O	do finálního objemu 25 µl

\*Lze použít i jiné objemy, jedinou podmínkou je, aby byl Aptamer Hot Start Master Mix naředěn 2x a aby byly dodrženy finální koncentrace.

2. Zamíchat pomocí 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 <sup>1</sup>	15 s	
Extenze	72°C	1 min na 1 kb	
Finální extenze	72°C	7 min	1
Chlazení	22°C		

<sup>1</sup> Je vhodné zjistit experimentálně; obvykle o 5°C nižší než teplota tání primerů.

5. Amplifikovaná DNA může být nanášena přímo do agarózového gelu bez nutnosti přidávat nanášecí pufr.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
A613	Aptamer Hot Start Master Mix (1x)	40 reakcí
A614	Aptamer Hot Start Master Mix (5x)	200 reakcí
A615	Aptamer Hot Start Master Mix (25x)	1000 reakcí
A615xl	Aptamer Hot Start Master Mix (100x)	4x 1000 reakcí

