

Instrukcja

RT PCR Mix EvaGreen®

Gotowa dwukrotnie stężona mieszanina do Real-Time PCR z EvaGreen® do analiz HRM.

numer katalogowy	wielkość
2008-100G	200 reakcji w 25 µl
2008-1000G	2000 reakcji w 25 µl

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzą w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

EvaGreen® jest zarejestrowanym znakiem towarowym Biotium Inc.

Opis

RT PCR Mix EvaGreen® jest gotową mieszaniną do Real-Time PCR do analiz HRM.

Mieszanina zawiera wszystkie składniki niezbędne do przeprowadzenia reakcji qPCR, poza matrycą DNA i starterami.

HRM (ang. *high resolution melt*) to odmiana reakcji Real-Time PCR, służąca do dyskryminacji różnych alleli za pomocą niewielkich różnic we wzorze krzywej topnienia produktów PCR.

Stosowanie gotowych mieszanin PCR oszczędza czas i ogranicza niebezpieczeństwo zanieczyszczenia próbki przez zmniejszenie ilości kroków pipetowania i wymaganych w reakcji PCR.

Mieszanina jest zoptymalizowana pod kątem wydajnego i powtarzalnego qPCR.

Skład

	2008-100G	2008-1000G	przechowywanie
RT PCR Mix EvaGreen®	2 x 1,25 ml	20 x 1,25 ml	-20 °C, chronić przed światłem
woda ultraczysta	2 x 1,5 ml	20 x 1,5 ml	-20 °C

Skład mieszaniny RT PCR Mix EvaGreen®

składnik	ilość
polimeraza DNA <i>Taq</i>	0,1 U/μl
MgCl ₂	4 mM
dNTPs	0,5 mM każdego z dNTP
2x bufor reakcyjny z EvaGreen®	

Uwagi

- Przed użyciem całkowicie rozmrozić w lodzie, delikatnie zworteksować i krótko zwirować.
- Cykliczne, siedmiokrotne rozmrażanie i zamrażanie nie wpływa na wydajność i aktywność produktu.

Proponowany protokół przygotowania reakcji qPCR

1. Rozmrozić składniki zestawu w lodzie, a następnie delikatnie zworteksować, krótko zwirować i wstawić ponownie do lodu.
2. Umieścić probówki reakcyjne PCR w lodzie i dodać kolejno:

składnik	objętość reakcji PCR		
	10 µl	25 µl	50 µl
RT PCR Mix EvaGreen®	5 µl	12,5 µl	25 µl
starter 1**	0,1-1 µM*	0,1-1 µM*	0,1-1 µM*
starter 2**	0,1-1 µM*	0,1-1 µM*	0,1-1 µM*
matryca DNA, cDNA	10 pg-1 µg	10 pg-1 µg	10 pg-1 µg
woda ultraczysta, uzupełnić	do 10 µl	do 25 µl	do 50 µl

* zalecane dla standardowego qPCR

** końcowe stężenie w mieszaninie reakcyjnej

3. Mieszaninę reakcyjną delikatnie zworteksować i krótko zwirować.
4. Probówki umieścić w termocyklerze i uruchomić program.

Proponowany profil PCR:

etap	temperatura	czas
wstępna denaturacja	95 °C	2-3 min
25-45 cykli	95 °C	15-30 s
	50-68 °C	30-60 s
	72 °C	15-60 s*

* w zależności od długości produktu PCR

Zalecana jest analiza topnienia produktu PCR.

Zalecane mieszaniny ROX

HIROX (0,6-1 µl na 50 µl całkowitej objętości reakcji): Applied Biosystems: 7000, 7300, 7700, 7900HT Fast, StepOne, StepOnePlus.

LoROX (0,6-1 µl na 50 µl całkowitej objętości reakcji): Applied Biosystems 7500, Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000P.



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

