syngen.pl kolumienki.pl

QUANTUM Probe PCR Kit
QUANTUM Probe +ROX PCR Kit
QUANTUM EvaGreen® PCR Kit
QUANTUM EvaGreen® +ROX PCR Kit
QUANTUM EvaGreen® HRM Kit

Zawartość opakowania i warunki przechowywania

QUANTUM Probe	SY570751	SY570752
5 x QUANTUM Probe MIX	1 ml	4 x 1 ml
	250 rx	1000 rx

QUANTUM Probe +ROX	SY570761	SY570762
5 x QUANTUM Probe +ROX MIX	1 ml	4 x 1 ml
	250 rx	1000 rx

QUANTUM EvaGreen	SY570711	SY570712
5 x QUANTUM EvaGreen MIX	1 ml	4 x 1 ml
	250 rx	1000 rx

QUANTUM EvaGreen +ROX	SY570721	SY570722
5 x QUANTUM EvaGreen +ROX MIX	1 ml	4 x 1 ml
	250 rx	1000 rx

QUANTUM EvaGreen HRM	SY570791	SY570792
5 x QUANTUM EvaGreen HRM MIX	1 ml	4 x 1 ml
	250 rx	1000 rx

Zestawy QUANTUM są niewrażliwe na okresowe przechowywanie w temperaturze pokojowej do 30 dni. Warunki standardowego przechowywania to -20°C.

Opis komponentów

QUANTUM Probe PCR Kit oraz QUANTUM EvaGreen® PCR Kit to gotowe do użycia 5-krotnie stężone miksy do ilościowej reakcji PCR zawierające polimerazę Gold Hot Start oraz wszystkie niezbędne składniki reakcji w optymalnych stężeniach, poza primerami/sondą, matrycą i wodą. W skład miksu poza polimerazą wchodzi także bufor reakcyjny QUANTUM, $MgCl_2$ w ostatecznym stężeniu 2,5 mM i mieszanina dNTP. W miksie QUANTUM EvaGreen® PCR Kit zawarty jest dodatkowo barwnik EvaGreen®. Zestawy z oznaczeniem +ROX zawierają w składzie dodatkowo pasywny barwnik ROX.

Gold Hot Start DNA Polymerase to rekombinowana termostabilna polimeraza Taq o masie cząsteczkowej 95 kDa pochodząca z *Thermus aquaticus*, syntetyzowana w *E.coli*. 1 U enzymu katalizuje przyłączenie 10 nmoli dNTP do powstającej nici DNA w kierunku od 5' do 3' w czasie 30 minut w temperaturze 74°C. Enzym posiada dodatkowo zależną od polimeryzacji aktywność egzonukleazową w kierunku od 5' do 3', brak jest natomiast aktywności egzonukleazowej w kierunku od 3' do 5'.

Polimeraza Gold Hot Start jest inaktywowana poprzez unikalną modyfikację chemiczną miejsca aktywnego, dzięki czemu wykazuje całkowitą nieaktywność w temperaturze pokojowej przed procesem standardowej aktywacji termicznej. Do inaktywacji polimerazy nie są stosowane kapsułki woskowe ani przeciwciała. Aktywacja enzymu następuje poprzez inkubację w temperaturze 95°C przez 15 minut przed pierwszym cyklem. Okres połowicznej utraty aktywności w temperaturze 95°C wynosi 1,5h.

Bufor reakcyjny QUANTUM tworzy idealne środowisko pracy polimerazy w reakcji real-time PCR. Jego unikalna kompozycja została oparta na Tris-HCl oraz $(NH_4)_2SO_4$, co optymalizuje przebieg reakcji i znacznie zwiększa specyficzność amplifikacji.

Przeznaczenie zestawów

Zestaw QUANTUM Probe PCR Kit jest zoptymalizowany do ilościowej reakcji PCR z zastosowaniem sond. Podstawowe wykorzystanie zakłada reakcję prowadzoną w monopleksie oraz po wstępnej optymalizacji także w multipleksach. Zestawy QUANTUM Probe PCR są kompatybilne z każdym rodzajem sond oraz ze wszystkimi termocyklerami, zarówno płytkowymi, jak i rotorowymi, kapilarnymi i mikropłytkowymi. Wersja +ROX przeznaczona jest dla termocyklerów ze zmienną drogą optyczną, wykorzystujących pasywny barwnik ROX.

W zestawie QUANTUM EvaGreen® PCR Kit zastosowano nowoczesny barwnik EvaGreen®, który pozwala na uzyskanie wyższej czułości i lepszej wydajności reakcji, a także w zależności od wariantu – barwnik ROX, wykorzystywany przez termocyklery ze zmienną drogą optyczną. Zestawy QUANTUM EvaGreen® PCR są kompatybilne ze wszystkimi termocyklerami odczytującymi barwniki typu FAM i SYBR® Green I, zarówno płytkowymi, jak i rotorowymi, kapilarnymi i mikropłytkowymi.

Przykłady kompatybilnych termocyklerów

QUANTUM Probe PCR Kit
QUANTUM EvaGreen® PCR Kit
zestawy kompatybilne z termocyklerami niewymagającymi barwnika referencyjnego ROX, w tym: Bio-Rad CFX96, CFX384, Opticon™, Opticon™ 2, Chromo 4™, MiniOpticon, Roche LightCycler® 1.5, 2.0, 480, Bioer LineGene 9600, 9600 Plus i K, Corbett Rotor-Gene™ 3000 i 6000, QIAGEN Rotor-Gene™ Q, Eppendorf MasterCycler® ep realplex, Cepheid SmartCycler™

QUANTUM Probe +ROX PCR Kit
QUANTUM EvaGreen® +ROX PCR Kit
zestawy kompatybilne z termocyklerami wykorzystującymi barwnik referencyjny ROX, w tym: Bio-Rad iCycler iQ™, MyiQ, iQ5, ABI PRISM® StepOne/Plus, GeneAmp 5700, ABI PRISM® 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT fast, ViiA 7, Stratagene Mx3000P™, Mx3005P™, Mx4000®

Użytkowanie zestawów QUANTUM na termocyklerach LighCycler 1.5 i LightCycler 2.0

Ze względu na powinowactwo składników reakcji (w tym polimerazy) do szkła, z którego wykonane są kapilary reakcyjne wydajność reakcji może drastycznie spadać. Aby zablokować to niepożądane zjawisko, zalecamy dodatek

syngen.pl kolumienki.pl

BSA do mastermiksu reakcyjnego. W przypadku pracy z barwnikiem EvaGreen polecamy stosowanie zestawu Quantum EvaGreen HRM zamiast Quantum EvaGreen PCR, gdyż zawiera on w miksie dodatek BSA.

Procedura

QUANTUM Probe PCR Kit
QUANTUM Probe +ROX PCR Kit

Wszystkie kroki procedury zaleca się wykonywać na mokrym lodzie, jakkolwiek nie jest to bezwzględnie wymagane.

1. Miks należy całkowicie rozmrozić, zworteksować i zwirować.
2. Przygotować mastermiks reakcyjny zawierający wszystkie składniki podane w poniższej tabeli poza matrycowym DNA. Miks należy przygotować w ilości n+1, czyli o 1 większej, niż potrzeba na planowaną ilość próbek.

Składnik mastermiksu	Ilość na 1 reakcję	Stężenie w reakcji
5 x QUANTUM Probe MIX	4 ul	1x
10 uM Primer F	0,4-0,8 ul	0,2-0,4 uM
10 uM Primer R	0,4-0,8 ul	0,2-0,4 uM
10 uM Sonda	0,2-0,5 ul	0,1-0,25 uM
Matrycowe DNA	< 200 ng	< 10 ng/ul
Woda do PCR	dopełnić do 20 ul	-
Objętość reakcji	**20 ul**	**-**

3. Wymieszać mastermiks przez wielokrotne pipetowanie całej objętości lub worteksowanie.
4. Rozpipetować mastermiks do probówek reakcyjnych.
5. Dodać matrycowe DNA do każdej probówki i wymieszać pipetując.
   Jeśli DNA pochodzi bezpośrednio z innej reakcji enzymatycznej, nie należy przekraczać 15% objętości reakcji, z powodu potencjalnego konfliktu buforów reakcyjnych.
6. Umieścić szczelnie zamknięte probówki reakcyjne w termocyklerze i nastawić reakcję typu hot start z 15-minutową aktywacją w 95°C. Zalecane warunki reakcji przedstawia poniższa tabela.

Krok cyklu	Temp.	Czas	Koment.
Aktywacja enzymu i wstępna denaturacja	95°C	15 min.	
Denaturacja	95°C	15 sek.	40 cykli
Annealing/Elongacja	60°C	60 sek.	

W termocyklerach z odczytem od góry nie należy opisywać wieczek probówek. W termocyklerach z odczytem od dołu należy zwrócić uwagę na czystość spodu probówek (należy usunąć pozostałości wody z mokrego lodu) przed umieszczeniem ich w bloku.

Procedura

QUANTUM EvaGreen® PCR Kit
QUANTUM EvaGreen® +ROX PCR Kit
QUANTUM EvaGreen® HRM Kit

Wszystkie kroki procedury zaleca się wykonywać na mokrym lodzie, jakkolwiek nie jest to bezwzględnie wymagane.

1. Miks należy całkowicie rozmrozić, zworteksować i zwirować.
2. Przygotować mastermiks reakcyjny zawierający wszystkie składniki podane w poniższej tabeli poza matrycowym DNA. Miks należy przygotować w ilości n+1, czyli o 1 większej, niż potrzeba na planowaną ilość próbek.

Składnik mastermiksu	Ilość na 1 reakcję	Stężenie w reakcji
5 x QUANTUM EvaGreen® MIX	4 ul	1x
10 uM Primer F	0,16-0,5 ul	0,08-0,25 uM
10 uM Primer R	0,16-0,5 ul	0,08-0,25 uM
Matrycowe DNA	< 200 ng	< 10 ng/ul
Woda do PCR	dopełnić do 20 ul	-
Objętość reakcji	**20 ul**	**-**

3. Wymieszać mastermiks przez wielokrotne pipetowanie całej objętości lub worteksowanie.
4. Rozpipetować mastermiks do probówek reakcyjnych.
5. Dodać matrycowe DNA do każdej probówki i wymieszać pipetując.
   Jeśli DNA pochodzi bezpośrednio z innej reakcji enzymatycznej, nie należy przekraczać 15% objętości reakcji, z powodu potencjalnego konfliktu buforów reakcyjnych.
6. Umieścić szczelnie zamknięte probówki reakcyjne w termocyklerze i nastawić reakcję typu hot start z 15-minutową aktywacją w 95°C. Zalecane warunki reakcji przedstawia poniższa tabela.

Krok cyklu	Temp.	Czas	Koment.
Aktywacja enzymu i wstępna denaturacja	95°C	15 min.	
Denaturacja	95°C	15 sek.	
Annealing	60-65°C	20 sek.	40 cykli
Elongacja	72°C	20 sek.	

W termocyklerach z odczytem od góry nie należy opisywać wieczek probówek. W termocyklerach z odczytem od dołu należy zwrócić uwagę na czystość spodu probówek (należy usunąć pozostałości wody z mokrego lodu) przed umieszczeniem ich w bloku.

Producent

Syngen Biotech Sp. z o.o. Sp. k.
54-116 Wrocław, ul. Ostródzka 13
tel. 71 349 70 13, 71 349 91 66, 71 349 61 67, faks 71 349 70 33
kolumienki.pl, syngen.pl, info@syngen.pl