

Master Mix qPCR con SYBR Highway

Presentación:

Este Kit K1050 *Highway* contiene:

- 1 vial con 1,25 ml de Master Mix qPCR con SYBR 2X (M130), suficiente para 100 reacciones de 25 µl volumen final
- 1 vial con 15 µl de ROX 25 µM (B0320)
- 1 vial con 1,5 ml Agua ultrapura libre de nucleasas (A0103)

Descripción:

La Master Mix qPCR 2X (M130) ha sido formulada para contener todos los componentes necesarios para llevar a cabo una Real Time PCR. Solo es necesario agregar los primers y el ADN templado, lo cual minimiza las posibilidades de error y de contaminación. La Mix contiene una Hot Start ADN polimerasa, dNTPs, buffer optimizado, MgCl₂ y SYBR Green I en concentraciones óptimas para lograr una eficiente amplificación. El SYBR Green I permite la detección universal de cualquier producto de PCR. **Contiene Rox en vial aparte (opcional).**

La tecnología Hot Start con anticuerpos anti Taq ADN Polimerasa permite una mayor especificidad y reproducibilidad.

Detección: Este reactivo puede ser utilizado en equipos de detección general como Line Gene (Bioer Technology co.). También puede ser utilizado en equipos de detección como: Light Cycler (Roche Molecular Systems), ABI PRISM 7000, 7700 y 7900 (Applied Biosystems).

Control de calidad: Ausencia de endodeoxiribonucleasas, exodeoxiribonucleasas y ribonucleasas. Amplificación comprobada de un gen de copia única de ADN genómico humano.

PROTOCOLO

1. Descongelar la Master Mix qPCR 2X *Highway* y mezclarla suavemente.
2. Preparar los reactivos para la reacción:

REACTIVO	VOLUMEN (25 µl final)	VOLUMEN (50 µl final)	CONCENTRACION FINAL
Master Mix qPCR 2X <i>Highway</i> (M130)	12,5 µl	25 µl	1X
Primer Forward 10 µM	0,75 µl	1,5 µl	0,3 µM*
Primer Reverse 10 µM	0,75 µl	1,5 µl	0,3 µM*
ROX 25 µM <i>Highway</i> (opcional)	Según equipo	Según equipo	50 nM/500 nM o no requiere **
ADN templado	1-5 µl	1-5 µl	< 500 ng
Agua ultrapura <i>Highway</i> (A0103)	c.s.p 25 µl	c.s.p 50 µl	

Nota: En caso de emplear otro volumen de reacción, considerar que el volumen colocado de Master Mix qPCR debe ser la mitad del volumen final del cocktail. De esta manera, los reactivos contenidos en la Master Mix 2X, quedarán en una concentración final 1X.

* La concentración de los primers en la mezcla no debería exceder los 0,3 μM . Concentraciones más altas podrían resultar en amplificaciones inespecíficas.

** Chequear la cantidad de Rox óptima a adicionar según el equipo en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1.

EQUIPO	CONCENTRACIÓN FINAL DE ROX
Applied Biosystems: 7300, 7900HT, Step One, Step One Plus, ABI PRISM 7000 y 7700	500 nM
Applied Biosystems: 7500 Stratagene: Mx3000P, Mx3005P, Mx4000	50 nM
Bio-Rad: iCycler IQ, iQ5, MyiQ, Opticon CFX 96, CFX 384 Roche: Light Cycler 480, Light Cycler 2.0 Corbett: Rotor Gene 3000,6000 Eppendorf: Master Cycler ep realplex Cepheid: Smart Cycler	No requiere

PROGRAMA DE TERMOCICLADO

Activación inicial	95	10 min	40 ciclos
Desnaturalización	95	15 seg	
Annealing/Extensión	60	1 min	

Curva de Melting

95°C.....15 seg

60°C.....1 min

95°C.....15 seg

Conservación:

Se recomienda conservar a -20°C, protegido de la luz. Evitar sucesivos congelamientos y descongelamientos de la Master Mix y la solución de Rox.

USO EN INVESTIGACIÓN IN VITRO