

Tiaris™ Blood Direct PCR Kit

Ordering Info

TBK1018, 80 reactions of 25 µL

TBK1019, 480 reactions of 25 µL

Description

Tiaris™ Blood Direct PCR kit allows direct PCR analysis of whole blood sample, without the need of DNA purification and sample preparation. The kit combines a simple but efficient DNA extraction method with direct amplification using our Fast Hot Start DNA polymerase in a convenient and easy-to-use manner. This kit is applicable for fresh blood, blood stored at 4°C and dried blood spot stored on DBS commercial cards. DNA extraction is carried out in a single tube, without the need of multiple washing steps, therefore minimizing the risk of contamination. The Fast Hot Start DNA polymerase Master Mix contains premixed gel loading dye which allows direct sample loading on agarose gel.

Features

- DNA is ready for PCR in only 15 minutes.
- Amplicon size: up to 5kb.
- Extension Rate 4-8 kb/min.
- Compatible with fast and standard PCR program.

Kit Components

Components	TBK1018	TBK1019
Lysis Buffer A	1.6 mL	6 x 1.6 mL
Lysis Buffer B	800 µL	6 x 800 µL
PCR-grade water	1 mL	6 x 1 mL
Fast Hot Start DNA polymerase Master Mix(2x)	1 mL	6 x 1 mL

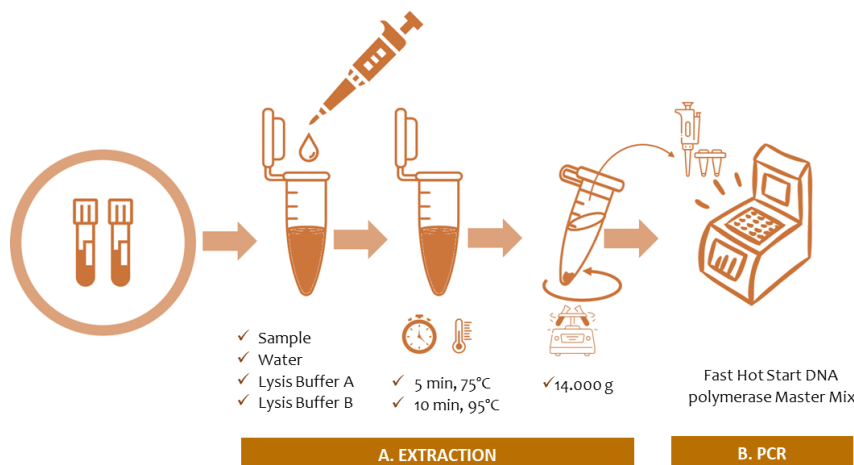
Order Info Kit Components: Lysis Buffer A (TBK1018-1) | Lysis Buffer B (TBK1018-2) | Fast Hot Start DNA polymerase Master Mix, 2x (TBK1028) | PCR Grade Water (TBB0303).

Storage

Shipped on blue ice. Upon receipt, kit components should be immediately stored at -20°C. No loss of performance is detected after 20 freeze/thaw cycles.

Applications

- Direct PCR
- Genotyping (such as gene detection) analysis
- Multiplex PCR



PROTOCOL

A. EXTRACTION

1. Prepare for each sample **100 µL** reaction mixture consisting of **70 µL PCR-grade water**, **20 µL Lysis Buffer A**, and **10 µL Lysis Buffer B**.
2. Cover each sample (*see Part C*) with 100 µL of reaction mixture and incubate at 75°C for 5 minutes (*lysis and protein denaturation*).
3. Heat-inactivate by incubation at 95 °C for 10 minutes.
4. Centrifuge at 14,000-16,000g for 1 minute to pellet debris and transfer the cleared supernatant to a new DNase-free microtube. Any remaining visible residue will not have a negative impact on the downstream PCR.
5. Store at -20°C for up to several months, or proceed with PCR directly.

B. PCR AMPLIFICATION

1. Gently vortex and briefly centrifuge Fast Hot Start DNA polymerase Master Mix after thawing.
2. Place a tube on ice and add the following components for each 25 µL reaction. Prepare sufficient master mix for the number of reactions. Consider one or two extras:

Components	Volume	Final Concentration
Fast Hot Start DNA polymerase Master Mix	12.5 µL	1X
Forward primer (5 pmol/µL)	2 µL	400 nM
Reverse primer (5 pmol/µL)	2 µL	400 nM
Diluted DNA extract (<i>Step 5</i>)	1 µL	*
PCR Grade Water, nuclease-free	7.5 µL	
Final Volume	25 µL	

* Please note that it might be necessary to optimize the amount of template. We recommend to dilute the DNA extract 10-fold with PCR-grade water (e.g. 5 µL of DNA extract + 45 µL PCR Grade Water) and then use, as indicated in the table, 1 µL as template. This 10-fold dilution ensures the dilution of PCR inhibitors. If the DNA concentration is too low, one can dilute less (e.g. 5-fold or undiluted), however, this might result in a less efficient amplification as the concentration of inhibitors will also be higher and it might be necessary to adapt the cycling conditions (number of cycles and/or extension time). Alternatively, results might be improved if template DNA is diluted even more (e.g. 20-fold).

3. Dispense the reaction mix into wells of PCR plate.
4. Gently vortex and spin down the samples.
5. Add in each well the DNA sample (*diluted DNA extract**). Mix well by pipetting.
6. Seal the PCR plate with optical film.

7. Set-up PCR amplification. The amplification parameters should be optimized for individual primers, template, and thermal cycler.

Step	Cycles	Temperature	Time
Initial denaturation	1 x	95 °C	3:00
Denaturation		95 °C	0:15
Annealing	40 x	T _m	0:15
Extension		70 °C	**
Final Extension	1 x	70 °C	3:00
Conservation	1 x	4 °C	∞

** 2 to 75 seconds at 70°C for extension (2 seconds for targets below 1 kb and 15 seconds per kb for target DNA up to 5kb. 90 seconds total per cycle in case of multiplex PCR, independent of the sizes of the amplicons).

C. SAMPLE GUIDELINES

Sample (fresh or frozen)	Amount	Extraction Volume
Blood (mammalian)	2 – 8 µL (with EDTA as anti-coagulant)	100 µL
Dried Blood Spot Cards	2 mm ²	100 µL

Tiaris™ Blood Direct PCR Kit

Referencias

TBK1018, 80 reactions of 25 µL

TBK1019, 480 reactions of 25 µL

Descripción

Tiaris™ Blood Direct PCR kit permite el análisis directo por PCR de muestras de sangre completa, sin necesidad de purificación de ADN ni preparación de muestras. El kit combina un método de extracción de ADN simple y eficiente con amplificación directa utilizando nuestra Fast Hot-Start DNA polimerasa de un modo conveniente y fácil de usar. Este kit es aplicable para sangre fresca, sangre almacenada a 4°C y muestras de sangre seca almacenadas en tarjetas comerciales DBS. La extracción de ADN se realiza en un solo tubo, sin necesidad de múltiples pasos de lavado, lo que minimiza el riesgo de contaminación. **Fast Hot-Start DNA polymerase Master Mix** contiene un colorante premezclado, lo que permite cargar directamente el producto amplificado en gel de agarosa y monitorizar la migración.

Características

- ADN listo para la PCR en solo 15 minutos.
- Tamaño de amplicón: hasta 5 kb.
- Extensión de 4-8 kb/min.
- Compatible con programas de PCR rápidos y estándar.

Componentes

Componentes	TBK1018	TBK1019
Lysis Buffer A	1,6 mL	6 x 1,6 mL
Lysis Buffer B	800 µL	6 x 800 µL
PCR-grade water	1 mL	6 x 1 mL
Fast Hot Start DNA polymerase Master Mix(2x)	1 mL	6 x 1 mL

Referencias Componentes: Lysis Buffer A (TBK1018-1) | Lysis Buffer B (TBK1018-2) | Fast Hot Start DNA polymerase Master Mix, 2x (TBK1028) | PCR Grade Water (TBB0303).

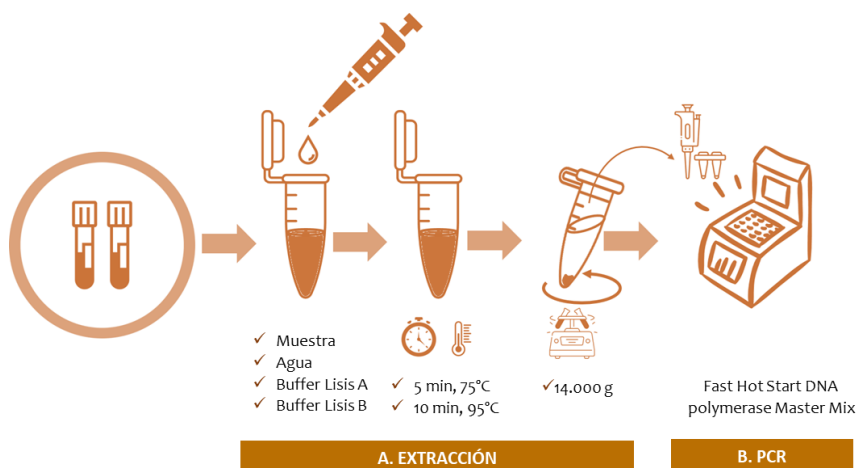
Almacenaje

Se envía en hielo azul. Al recibirlo, los componentes del kit deben almacenarse inmediatamente a -20°C.

No hemos detectado pérdida de rendimiento después de 20 ciclos de congelación/descongelación.

Aplicaciones

- PCR Directa
- Genotipado
- PCR Multiplex



PROTOCOLO

A. EXTRACCIÓN

1. Preparar por cada muestra **100 µL** de mezcla de reacción compuesta por **70 µL PCR-grade water**, **20 µL Lysis Buffer A**, y **10 µL Lysis Buffer B**.
2. Cubrir las muestras (*ver apartado C*) con 100 µL de mezcla de reacción e incubar a 75°C durante 5 minutos (*lisis y desnaturalización de proteínas*).
3. Para inactivar por calor, incubar a 95 °C durante 10 minutos.
4. Centrifugar a 14.000-16.000 g, 1 minuto y transferir el sobrenadante a un tubo limpio libre de DNasa. Cualquier residuo restante visible no tendrá un impacto negativo en la PCR.
5. Conservar a -20°C durante varios meses, o proceder directamente con la PCR.

B. AMPLIFICACIÓN POR PCR

1. Tras descongelar en hielo, dar un vortex suave seguido de una breve centrifugación a Fast Hot Start DNA polymerase Master Mix (2x).
2. Colocar un tubo en hielo y añadir los siguientes componentes por cada 25 µL de reacción. Preparar suficiente mezcla en función del número de muestras a analizar. Considerar una o dos reacciones extras:

Componentes	Volumen	Concentración Final
Fast Hot Start DNA polymerase Master Mix (2x)	12,5 µL	1x
Forward primer (5 pmol/µL)	2 µL	400 nM
Reverse primer (5 pmol/µL)	2 µL	400 nM
ADN diluido (Paso 5)	1 µL	*
PCR Grade Water, nuclease-free	7,5 µL	
Volumen Final	25 µL	

* Tenga en cuenta que podría ser necesario optimizar la cantidad de molde. Recomendamos diluir el ADN 10 veces con agua de calidad para PCR (por ejemplo, 5 µL de extracto de ADN + 45 µL de agua de calidad para PCR) y luego usar, como se indica en la tabla, 1 µL como templado. Esta dilución 10 veces asegura la dilución de los inhibidores de PCR. Si la concentración de ADN es demasiado baja, se puede diluir menos (por ejemplo, 5 veces o sin diluir), sin embargo, esto podría resultar en una amplificación menos eficiente, ya que la concentración de inhibidores también será mayor, y podría ser necesario adaptar las condiciones del ciclo (número de ciclos y/o tiempo de extensión). Alternativamente, los resultados podrían mejorar si se diluye aún más el ADN templado (por ejemplo, 20 veces).

3. Dispensar la mezcla en los pocillos de la placa de PCR.
4. Dar un vortex suave y un spin a los tubos de muestras.
5. Añadir en cada pocillo la muestra de ADN (*diluir el ADN extraído**). Mezclar bien por pipeteo.
6. Sellar la placa de PCR con film óptico.

7. Programar el termociclador según las condiciones sugeridas. Los parámetros de amplificación deben optimizarse para los cebadores, el molde y el termociclador.

Pasos	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1 x	95 °C	3:00
Desnaturalización		95 °C	0:15
Anillamiento	40 x	Tm	0:15
Extensión		70 °C	**
Extensión Final	1 x	70 °C	3:00
Conservación	1 x	4 °C	∞

** De 2 a 75 segundos a 70°C para la extensión (2 segundos para moldes de menos de 1 kb y 15 segundos por kb para moldes de hasta 5 kb. Un total de 90 segundos por ciclo en caso de PCR multiplex, independientemente del tamaño de los amplicones).

C. GUÍA PARA MUESTRAS

Muestras (frescas o congeladas)	Cantidad	Volumen Extracción
Sangre (mamíferos)	2 – 8 µL (con EDTA como anticoagulante)	100 µL
Tarjetas con Muestras de Sangre Seca	2 mm ²	100 µL