

## STR Multiplex ASPident10 Kit

(katalogové číslo STR011)

### Popis produktu

Produktová řada STR Multiplex kit je určena na rutinní provádění STR analýz u rozličných druhů sladkovodních ryb v Evropě. STR Multiplex ASPident10 Kit je určen výhradně pro genetické studie bolenů (*Leuciscus aspius*) a je cenově dostupnější variantou ke kitu STR Multiplex ASPident12. Patří ke kitům s možností generování dat koordinovaným a standardizovaným způsobem. Tzn., že hodnoty alel lze kalibrovat pomocí kalibračních standardů, které jsou přiloženy v soupravě. To pak umožňuje spolehlivější porovnávání studií z různých laboratoří a v rozličném čase.

Kit je navržen ve tří-multiplexním designu s lyofilizovanými primerovými páry ve standardní škále 10 – 25 nmol. STR panel je postaven na 10 lokusech a využívá standardní pěti barevnou sadu DS-33 (Tab. 1). Systém předpokládá min. 10 - 50 ng templátu DNA. Spolehlivá interpretace je založena na designu nepřekrývajících se alelických rozmezí lokusů a na krátkých ampliconech zvyšující pravděpodobnost obdržení celého profilu i z degradovaných vzorků. Kit je kompatibilní s genetickými analyzátoři Applied Biosystems.

Tab. 1. Popis multiplexního designu kitu STR Multiplex ASPident10

Multiplex	Lokus	Škála (nmol)	Ta (°C)	ABI značení	STR motiv	Rozmezí alel (bp)	Citace†
M1	ASP1	25	57	6-FAM	di- a tetra	159-167	ASPident10
M1	ASP2	10	57	PET	di-	190-222	ASPident10
M1	ASP3	25	57	6-FAM	di-	220-234	ASPident10
M1	ASP4	25	57	6-FAM	di-	342-408	ASPident10
M2	ASP5	25	57	6-FAM	di-	94-112	ASPident10
M2	ASP6	25	57	6-FAM	di-	175-185	ASPident10
M2	ASP7	25	57	6-FAM	di-	237-281	ASPident10
M3	ASP9	25	57	6-FAM	di-	143-147	ASPident10
M3	ASP10	25	57	6-FAM	di-	190-200	ASPident10
M3	ASP11	25	57	6-FAM	di- a tri-	236-240	ASPident10

†Pro citování v článku: STR Multiplex ASPident11 Kit, kat. č. STR011, Institute of Vertebrate Biology, Brno, Czech Republic

## Příprava zásobních roztoků

Zkumavky před následnými kroky třeba stočit na centrifuze. Pro získání koncentrace 100 pmol/μl (0,1mM roztok) jednotlivé lyofilizované primery v 10 a 25 nmol škále rozpustit v konkrétním objemu PCR H<sub>2</sub>O (μl) dle vzorce: Cont (nmol) x 10. Konkrétní Cont hodnoty jsou uvedeny na zkumavkách primerů. Dále ředit každý pár primerů na 10 μM zásobní roztok: 10 μl F + 10 μl R + 80 μl PCR H<sub>2</sub>O. Poté následuje míchání multiplexu M1, M2 a M3 dle protokolu níže.

## Protokol

Reakční mix připravovat na objem 7 μl, viz Tab. 2.

Tab. 2. Reakční setup pro multiplexní PCR

Set M1	V (7 μl)		Set M2	V (7 μl)		Set M3	V (7 μl)
2x QMM*	3,5	<b>S</b>	2x QMM*	3,5	<b>i</b>	2x QMM*	3,5
PCR H <sub>2</sub> O	1,7	<b>T</b>	PCR H <sub>2</sub> O	1,9	<b>d</b>	PCR H <sub>2</sub> O	1,95
ASP1	0,2	<b>R</b>	ASP5	0,2	<b>e</b>	ASP9	0,15
ASP2	0,2	<b>A</b>	ASP6	0,2	<b>n</b>	ASP10	0,2
ASP3	0,15	<b>S</b>	ASP7	0,2	<b>t</b>	ASP11	0,2
ASP4	0,25	<b>P</b>	DNA	1	<b>11</b>	DNA	1
DNA	1						

\*2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix

## PCR podmínky

Postupovat dle doporučení výrobce kitu Qiagen Multiplex PCR pro amplifikaci mikrosatelitů a krátkých amplikonů s využitím multiplexní PCR. A dle Tab. 1 (Ta - annealing).

## Kalibrační standardy

Na vyžádání mohou být k soupravě přiloženy DNA izoláty kalibračních standardů pro porovnávání studií připravovaných v rozličném čase. Objem kalibrátorů je standardně 15 μl. Multiplexní PCR je připravována dle stejného protokolu viz výše.

## Kit neobsahuje

Před započítáním testování třeba zakoupit Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, kat. č. 206143 nebo 206145) a velikostní standard GeneScan<sup>TM</sup>- 600 LIZ<sup>®</sup> (Life Technologies, kat. č. 4408399; rozsah 20-600 bp).

## Podmínky skladování

Uchovávat při T = -20°C. Fluorescenční primery jsou fotosensitivní, proto třeba minimalizovat jejich světelnou expozici. Doporučeno zásobní roztok rozpíjetovat do více alikvótů.

*Pozn. Vaše zpětná vazba je pro nás cenná, děkujeme za neustálé vylepšování designu soupravy. Poslední revize 11/2023.*