

STR Multiplex ASPident12 Kit

(katalogové číslo STR011b)

Popis produktu

Produktová řada STR Multiplex kit je určena na rutinní provádění STR analýz u rozličných druhů sladkovodních ryb v Evropě. STR Multiplex ASPident12 Kit je určen výhradně pro genetické studie bolenů (*Leuciscus aspius*). 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 12 lokusech: ASP1 - ASP12 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 analyzátory Applied Biosystems.

Tab. 1. Popis multiplexního designu kitu STR Multiplex ASPident12

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	ASPident12
M1	ASP2	10	57	PET	di-	190-222	ASPident12
M1	ASP3	25	57	6-FAM	di-	220-234	ASPident12
M1	ASP4	25	57	6-FAM	di-	342-408	ASPident12
M2	ASP5	25	57	6-FAM	di-	94-112	ASPident12
M2	ASP6	25	57	6-FAM	di-	175-185	ASPident12
M2	ASP7	25	57	6-FAM	di-	237-281	ASPident12
M2	ASP8_1*	25	57	6-FAM	di-	322-338	ASPident12
	ASP8_2*					336-370	
M3	ASP9	25	57	6-FAM	di-	143-147	ASPident12
M3	ASP10	25	57	6-FAM	di-	190-200	ASPident12
M3	ASP11	25	57	6-FAM	di- a tri-	236-240	ASPident12
M3	ASP12	10	57	PET	di-	112-132	ASPident12

*Primery ASP8 amplifikují 2 lokusy; †Pro citování v článku: STR Multiplex ASPident12 Kit, kat. č. STR011b, 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 H₂O (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 H₂O. 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	S	2x QMM*	3,5	i	2x QMM*	3,5
PCR H ₂ O	1,7	T	PCR H ₂ O	1,7	d	PCR H ₂ O	1,75
ASP1	0,2	R	ASP5	0,2	e	ASP9	0,15
ASP2	0,2	A	ASP6	0,2	n	ASP10	0,2
ASP3	0,15	S	ASP7	0,2	t	ASP11	0,2
ASP4	0,25	P	ASP8	0,2	12	ASP12	0,2
DNA	1		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 GeneScanTM- 600 LIZ[®] (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 rozpipetovat do více alikvótů.

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