

STR Multiplex OMident12 Kit

(katalogové číslo STR004s)

Popis produktu

Produktová řada STR Multiplex kit je určena na rutinní provádění STR analýz u rozličných druhů sladkovodních ryb v Evropě. STR Multiplex OMident12 Kit je určen výhradně pro genetické studie pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). 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 dvou multiplexním US-EU designu s lyofilizovanými primerovými páry ve standardní škále 10 - 25 nmol. STR panel je postaven na 12 lokusech: OMY1 – OMY12 a využívá standardní pěti barevnou sadu DS-33 (Tab. 1). Lokus OMY6 je určen pro monitoring ♀/♂ pohlaví. Systém předpokládá min. 10 - 50 ng templátu DNA. Spolehlivá interpretace je založena na designu nepřekrývajících se alelických rozmezí lokusů a na krátkých amplikonech <345 bp 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 OMident12

| Multiplex | Lokus | Škála (nmol) | Ta (°C) | ABI značení | STR motiv | Rozmezí alel (bp) | Citace† |
|-----------|-------|--------------|---------|-------------|-----------|-------------------|-----------|
| M1 | OMY1 | 25 | 55 | 6-FAM | di- | 92-128 | OMident12 |
| M1 | OMY2 | 25 | 55 | 6-FAM | tri- | 255-279 | OMident12 |
| M1 | OMY3 | 10 | 55 | VIC | tri- | 105-141 | OMident12 |
| M1 | OMY4 | 10 | 55 | NED | di- | 150-196 | OMident12 |
| M1 | OMY5 | 10 | 55 | PET | di- | 157-201 | OMident12 |
| M1 | OMY6 | 25 | 55 | 6-FAM | Sex* | 344 | OMident12 |
| M2 | OMY7 | 10 | 55 | PET | tetra- | 166-206 | OMident12 |
| M2 | OMY8 | 10 | 55 | VIC | di- | 114-180 | OMident12 |
| M2 | OMY9 | 10 | 55 | NED | tetra- | 84-196 | OMident12 |
| M2 | OMY10 | 25 | 55 | 6-FAM | tetra- | 205-321 | OMident12 |
| M2 | OMY11 | 25 | 55 | 6-FAM | tetra- | 96-120 | OMident12 |
| M2 | OMY12 | 10 | 55 | PET | di- | 258-280 | OMident12 |

*Lokus monitorující male-specific Y-chromosome sekvenci; †Pro citování v článku: STR Multiplex OMident12 Kit (kat. č. STR004s), 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 nebo 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 a M2 dle protokolu níže.

Protokol

Reakční mix připravovat do objemu 7 μl, viz Tab. 2.

Tab. 2. Reakční setup pro multiplexní PCR

| Set M1 | V (7 μl) | | Set M2 | V (7 μl) |
|----------------------|----------|------------|----------------------|----------|
| 2x QMM* | 3,5 | STR | 2x QMM* | 3,5 |
| PCR H ₂ O | 1,8† | O | PCR H ₂ O | 1,695† |
| OMY1 | 0,105 | M | OMY7 | 0,14 |
| OMY2 | 0,105 | i | OMY8 | 0,14 |
| OMY3 | 0,105 | d | OMY9 | 0,14 |
| OMY4 | 0,105 | e | OMY10 | 0,105 |
| OMY5 | 0,14 | n | OMY11 | 0,14 |
| OMY6 | 0,14 | t | OMY12 | 0,14 |
| DNA | 1† | 12 | DNA | 1† |

*2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix; †Regulace dle koncentrace

PCR podmínky

Postupovat dle doporučení výrobce kitu Qiagen Multiplex PCR pro amplifikaci mikrosatelitů a krátkých amplikonů (počet cyklů 27) 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.*