

STR Multiplex SALVident10 Kit

(katalogové číslo STR003)

Popis produktu

Produktová řada STR Multiplex kit je určena na rutinní provádění STR analýz u rozličných druhů sladkovodních ryb v Evropě. STR Multiplex SALVident10 Kit je určen výhradně pro genetické studie 4 druhů sivenů (genus *Salvelinus*: *S. fontinalis*, *S. namaycush*, *S. alpinus*, *S. umbla*). Lze jej využít i pro potvrzení mezidruhové hybridizace mezi SF-SN-SA/SU. 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 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 amplikonech 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 SALVident10

Multiplex	Lokus	Škála (nmol)	Ta (°C)	ABI značení	STR motiv	Rozmezí alel (bp)	Citace†
M1	SALV1	25	55	6-FAM	di-	218-252	SALVident10
M1	SALV2	25	55	6-FAM	tetra-	176-184	SALVident10
M1	SALV3	10	55	NED	di-	100-222	SALVident10
M1	SALV4	10	55	PET	tri-	135-240	SALVident10
M1	SALV5	10	55	VIC	di-	142-248	SALVident10
M2	SALV7	25	55	6-FAM	tetra-	140-152	SALVident10
M2	SALV8	10	55	VIC	di-	128-144	SALVident10
M2	SALV9	10	55	PET	di-/tetra-	116-204	SALVident10
M2	SALV10	25	55	6-FAM	di-	191-265	SALVident10
M2	SALV11	10	55	NED	di-	142-178	SALVident10

†Pro citování v článku: STR Multiplex SALVident10 Kit (kat. č. STR003, 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 o 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†	SALV	PCR H ₂ O	1,905†
SALV1	0,14	i	SALV7	0,14
SALV2	0,105	d	SALV8	0,105
SALV3	0,14	e	SALV9	0,105
SALV4	0,14	n	SALV10	0,14
SALV5	0,175	t	SALV11	0,105
DNA	1†	10	DNA	1†

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

PCR podmínky

Postupovat dle následujících podmínek: 94 °C/3 min, 30 cyklů: 94 °C /45 s, 55 °C /90 s a 65 °C /60 s, závěrečná extenze 60 °C /30 min.

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 započítím testování třeba zakoupit Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, kat. č. 206143 nebo 206145) a velikostní standard GeneScanTM- 600 LIZ[®] (SEQme/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 z důvodu vyhnutí se opakovanému rozmrazování a zmrazování.