

STR Multiplex THYMident13 Kit

(katalogové číslo STR014b)

Popis produktu

Produktová řada STR Multiplex kit je určena na rutinní provádění STR analýz u rozličných druhů sladkovodních ryb v Evropě. STR Multiplex THYMident13 Kit je určen výhradně pro genetické studie lipana podhorního (*Thymallus thymallus*). 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 13 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 THYMident13

Multiplex	Lokus	Škála (nmol)	Ta (°C)	ABI značení	STR motiv	Rozmezí alel (bp)	Citace†
M1	THYM1	25	58	6-FAM	di-	104-142	THYMident13
M1	THYM2	10	58	NED	di-	217-235	THYMident13
M1	THYM3	25	58	6-FAM	di-	229-233	THYMident13
M1	THYM4	25	58	6-FAM	tetra-	374-442	THYMident13
M2	THYM5*	25	58	6-FAM	di-	103-129	THYMident13
M2	THYM6	10	58	PET	tetra-	136-144	THYMident13
M2	THYM7	10	58	NED	tetra-	192-280	THYMident13
M2	THYM8	10	58	VIC	di-	208-228	THYMident13
M2	THYM9	25	58	6-FAM	tetra-	194-198	THYMident13
M3	THYM10	25	58	6-FAM	di-	134-150	THYMident13
M3	THYM11	10	58	VIC	di-	136-154	THYMident13
M3	THYM12	10	58	PET	tetra-	224-310	THYMident13
M3	THYM13	25	58	6-FAM	di-	237-243	THYMident13

*navíc peak 123 bp, †pro citování v článku: STR Multiplex THYMident13 Kit (kat.č. STR014b, Institute of Vertebrate Biology, Brno, Czech Republic).

Příprava zásobních roztoků

Zkumavky před následnými kroky třeba stočit na centrifuze. Pro získání koncentrace 100 pmol/ μ l (0,1mM roztok) jednotlivé lyofilizované primery v 10 nebo 25 nmol škále rozpustit v konkrétním objemu PCR H₂O (μ l) dle vzorce: Cont (nmol) x 10. Konkrétní Cont hodnoty jsou uvedeny na zkumavkách primerů. Dále ředit každý pár primerů na 10 μ M zásobní roztok: 10 μ l F + 10 μ l R + 80 μ l PCR H₂O. Poté následuje míchání multiplexu M1, M2 a M3 dle protokolu níže.

Protokol

Reakční mix připravovat na objem 7 μ l, viz Tab. 2.

Tab. 2. Reakční setup pro multiplexní PCR

Set M1	V (7 μ l)	S	Set M2	V (7 μ l)		Set M3	V (7 μ l)
2x QMM*	3,5	T	2x QMM*	3,5	i	2x QMM*	3,5
PCR H ₂ O	1,52†	R	PCR H ₂ O	1,73†	d	PCR H ₂ O	1,8†
THYM1	0,14	T	THYM5	0,14	e	THYM10	0,14
THYM2	0,21	H	THYM6	0,14	n	THYM11	0,14
THYM3	0,21	Y	THYM7	0,21	t	THYM12	0,28
THYM4	0,42	M	THYM8	0,14	13	THYM13	0,14
			THYM9	0,14			
DNA	1†		DNA	1†		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, 58 °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 μ l. 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.

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