

STR Multiplex THYMident9 Kit

(katalogové číslo STR014)

Popis produktu

Produktová řada STR Multiplex kit je určena na rutinní provádění STR analýz u rozličných druhů sladkovodních ryb v Evropě. STR Multiplex THYMident9 Kit je určen výhradně pro genetické studie lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) a je cenově dostupnější variantou ke kitu STR Multiplex THYMident13. 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 designu s lyofilizovanými primerovými páry ve standardní škále 10 – 25 nmol. STR panel je postaven na 9 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 THYMident9

Multiplex	Lokus	Škála (nmol)	Ta (°C)	ABI značení	STR motiv	Rozmezí alel (bp)	Citace†
M1	THYM1	25	58	6-FAM	di-	104-142	THYMident9
M1	THYM2	10	58	NED	di-	217-235	THYMident9
M1	THYM4	25	58	6-FAM	tetra-	374-442	THYMident9
M1	THYM10	10	58	PET	di-	134-150	THYMident9
M2	THYM5*	25	58	6-FAM	di-	103-129	THYMident9
M2	THYM7	10	58	NED	tetra-	192-280	THYMident9
M2	THYM8	10	58	VIC	di-	208-228	THYMident9
M2	THYM11	10	58	VIC	di-	136-154	THYMident9
M2	THYM12	25	58	6-FAM	tetra-	224-310	THYMident9

*navíc peak 123 bp, †pro citování v článku: STR Multiplex THYMident9 Kit (kat.č. STR014, 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 na objem 7 μl, viz Tab. 2.

Tab. 2. Reakční setup pro multiplexní PCR

Set M1	V (7 μl)	S	Set M2	V (7 μl)	
2x QMM*	3,5	T	2x QMM*	3,5	i
PCR H ₂ O	1,59†	R	PCR H ₂ O	1,59†	d
THYM1	0,14	T	THYM5	0,14	e
THYM2	0,21	H	THYM7	0,21	n
THYM4	0,42	Y	THYM8	0,14	t
THYM10	0,14	M	THYM11	0,14	9
			THYM12	0,28	
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 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 GeneScan™- 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.