

STR Multiplex TRUTident12 Kit

(katalogové číslo STR001b)

Popis produktu

Produktová řada STR Multiplex kit je určena na rutinní provádění STR analýz u rozličných druhů sladkovodních ryb v Evropě. STR Multiplex TRUTident12 Kit je určen výhradně pro genetické studie pstruha obecného (*Salmo trutta*). 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: TRU1 - TRU12 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 TRUTident12

Multiplex	Lokus	Škála (nmol)	Ta (°C)	ABI značení	STR motiv	Rozmezí alel (bp)	Citace†
M1	TRU1	10	57	VIC	di-	86-106	TRUTident12
M1	TRU2	25	57	6-FAM	di-	101-115	TRUTident12
M1	TRU3°	10	57	NED	tetra-	128-196	TRUTident12
M1	TRU6	25	57	6-FAM	di-	164-194	TRUTident12
M2	TRU5	25	57	6-FAM	di-	92-104	TRUTident12
M2	TRU4	25	57	6-FAM	di-	138-172	TRUTident12
M2	TRU7	25	57	6-FAM	tetra-	197-301	TRUTident12
M2	TRU8 ^x	10	57	PET	di-	197-212	TRUTident12
M3	TRU9	25	57	6-FAM	tetra-	114-186	TRUTident12
M3	TRU10	10	57	VIC	tetra-	146-230	TRUTident12
M3	TRU11	25	57	6-FAM	tetra-	181-293	TRUTident12
M3	TRU12*	10	57	PET	di-	126-194	TRUTident12

°vždy navíc pík 128 bp, ^xvždy navíc pík 156 bp, *vždy navíc pík 92 bp, †pro citování v článku: STR Multiplex TRUTident12 Kit (kat.č. STR001b, 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	1,66†	R	PCR H ₂ O	1,555†	d	PCR H ₂ O	1,59†
TRU1	0,21	T	TRU5	0,14	e	TRU9	0,14
TRU2	0,175	R	TRU4	0,28	n	TRU10	0,35
TRU3	0,175	U	TRU7	0,42	t	TRU11	0,21
TRU6	0,28	T	TRU8	0,105	12	TRU12	0,21
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, 57 °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 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.*