

STR Multiplex TRUTident9 Kit

(katalogové číslo STR001)

Popis produktu

Produktová řada STR Multiplex kit je určena na rutinní provádění STR analýz u rozličných druhů sladkovodních ryb v Evropě. STR Multiplex TRUTident9 Kit je určen výhradně pro genetické studie pstruha obecného (*Salmo trutta*) a je cenově dostupnější variantou ke kitu STR Multiplex TRUTident12. 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 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 TRUTident9

| Multiplex | Lokus | Škála (nmol) | T _a (°C) | ABI značení | STR motiv | Rozmezí alel (bp) | Citace† |
|-----------|-------|--------------|---------------------|-------------|-----------|-------------------|------------|
| M1 | TRU2 | 25 | 57 | 6-FAM | di- | 101-115 | TRUTident9 |
| M1 | TRU3° | 10 | 57 | NED | tetra- | 128-196 | TRUTident9 |
| M1 | TRU6 | 25 | 57 | 6-FAM | di- | 164-194 | TRUTident9 |
| M2 | TRU5 | 25 | 57 | 6-FAM | di- | 92-104 | TRUTident9 |
| M2 | TRU4 | 25 | 57 | 6-FAM | di- | 138-172 | TRUTident9 |
| M2 | TRU7 | 25 | 57 | 6-FAM | tetra- | 197-301 | TRUTident9 |
| M3 | TRU9 | 25 | 57 | 6-FAM | tetra- | 114-186 | TRUTident9 |
| M3 | TRU10 | 10 | 57 | VIC | tetra- | 146-230 | TRUTident9 |
| M3 | TRU11 | 25 | 57 | 6-FAM | tetra- | 181-293 | TRUTident9 |

° vždy navíc pík 128 bp, †pro citování v článku: STR Multiplex TRUTident9 Kit (kat.č. STR001, 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 | 1,87† | R | PCR H ₂ O | 1,66† | d | PCR H ₂ O | 1,8† |
| TRU2 | 0,175 | T | TRU4 | 0,28 | e | TRU9 | 0,14 |
| TRU3 | 0,175 | R | TRU5 | 0,14 | n | TRU10 | 0,35 |
| TRU6 | 0,28 | U | TRU7 | 0,42 | t | TRU11 | 0,21 |
| DNA | 1† | T | DNA | 1† | 9 | 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 rozpíjetovat 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.