

RevoDx DNA qPCR Probe

Master Mix Kit

Інструкція із застосування

Для ПЛР у реальному часі

Тільки для професійного використання

Каталожні номери:

IP201912-100 – 100 тестів

IP201912-500 – 500 тестів

Склад набору

	Компонент	100 тестів	500 тестів
1	Майстер-суміш (DNA qPCR Probe Mix)	1000 мкл	5 x 1000 мкл
2	Вода, вільна від нуклеаз (Nuclease-free Water)	1000 мкл	1000 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі від +2°C до +8°C. Усі компоненти RevoDx DNA qPCR Probe Master Mix Kit слід зберігати при температурі від -25°C до -15°C. Слід уникати зберігання при більш високих температурах. За умов належного зберігання всі компоненти набору залишаються стабільними до закінчення терміну придатності, вказаного на етикетці продукту. Реагент DNA qPCR Probe Mix не слід заморожувати-розморожувати більше 3 разів, оскільки це може призвести до зниження чутливості набору. За необхідності збільшення кількості циклів заморожування-розморожування, розділіть набір на кілька аликвот зручного об'єму та зберігайте при температурі від -25°C до -15°C.

Загальний опис

RevoDx DNA qPCR Probe Master Mix Kit – це набір нового покоління, призначений для виявлення та кількісного визначення ДНК. При цьому під час реплікації ДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридизується з ДНК-матрицею і руйнується 5'-3' ендонуклеазною активністю ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) в міру подовження праймера ПЛР. Зонд розщеплюється лише тоді, коли відбувається реплікація ДНК, при чому відбувається розділення молекули флуоресцентного барвника та молекули гасника. Утворені продукти ПЛР можна виявити протягом кількох хвилин завдяки підвищенню рівня флуоресценції, яке відбувається експоненціально з кожним наступним циклом ампліфікації у ході ПЛР.

RevoDx DNA qPCR Probe Master Mix Kit можна використовувати для ампліфікації будь-якої ДНК-матриці, включаючи геномну ДНК, бактеріальну ДНК та вірусну ДНК, для різних цілей, зокрема для генотипування, виявлення мікроорганізмів і визначення вірусного навантаження. Майстер-суміш (DNA qPCR Probe Mix) містить буфер, MgCl₂, dNTP, ензимну суміш, стабілізатори та енхансери в концентраціях, підібраних для оптимальної ефективності реакції. Набір RevoDx DNA qPCR Probe Master Mix Kit оптимізовано для використання з більшістю інструментів для ПЛР у реальному часі.

Характеристики набору

- Легке налаштування реакції
- Немає потреби в окремому етапі зворотної транскрипції
- Зменшення можливих помилок на етапі приготування суміші
- Швидкий результат
- Висока чутливість виявлення
- Сумісність з більшістю інструментів для ПЛР у реальному часі

Обмеження щодо використання продукту

- Оскільки робочі характеристики цього набору не підтверджені для конкретного мікроорганізму, користувач несе відповідальність за перевірку можливості використання набору для певного діапазону застосувань.
- Для отримання достовірних результатів необхідно дотримуватись правильних методів збору, транспортування, зберігання та обробки зразків.
- Набір призначений для професійного використання кваліфікованим персоналом, що пройшов відповідне навчання.
- Дотримуйтеся інструкцій з використання до наборів для отримання оптимальних результатів ПЛР.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Компоненти набору з різних серій не можна змішувати.

Інформація щодо безпеки

- Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; з ними слід працювати в зоні біобезпеки 1-го або 2-го рівня, залежно від збудника інфекції.
- Усі отримані відходи слід вважати потенційно інфекційними. З ними слід поводитись та утилізувати відповідно до місцевих правил безпеки.
- Уникайте будь-якого контакту шкіри з реагентами набору. У випадку контакту ретельно промити водою.
- Уникайте розбризкування та утворення аерозолів.
- Після роботи із клінічними зразками та реагентами необхідно мити руки.
- Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів тощо (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.
- При роботі в лабораторії використовувати засоби індивідуального захисту
- На початку та вкінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що всі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
- Поводьтесь з усіма матеріалами відповідно до правил роботи в лабораторіях, що проводять дослідження молекулярно-генетичними методами, щоб запобігти перехресній контамінації.
- Використовуйте тільки повірені/калібровані дозатори та наконечники з аерозольним фільтром.
- Зберігайте набір подалі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктами ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція ДНК/РНК, приготування реакційних сумішей, ампліфікація).
- Усе обладнання та витратні матеріали для конкретної операції повинні знаходитися в зоні, де виконується ця операція, і не повинні переміщатися між різними зонами. Рукавички слід змінювати при переході у кожну зону. Лабораторні халати повинні

бути окремими для кожної зони і їх не можна носити за межами цієї зони.

- Роботи повинні виконуватись в одному напрямку, починаючи із зони екстракції ДНК/РНК і закінчуючи відповідними зонами використання.

Додаткові матеріали та обладнання

- Праймери та зонди для відповідної мішені
- ДНК-матриця
- Ампліфікатор для ПЛР у режимі реального часу
- Відповідні ЗІЗ (халат, рукавички, окуляри)
- Мікропіпетки (0.5 мкл – 1000 мкл)
- Наконечники для дозаторів з аерозольним фільтром та маркуванням DNase/RNase-free
- Мікропробірки 1,5 мл з маркуванням DNase/RNase-free
- Вихровий змішувач (вортекс)
- Настільна мікроцентрифуга для ПЛР-планшетів/стрип-пробірок
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл
- Пробірки або планшети для ПЛР у реальному часі.

Зауваження перед використанням

Зразки ДНК, такі як геномна ДНК, бактеріальна ДНК та вірусна ДНК, можна використовувати як ДНК-матрицю. Для екстракції ДНК зі зразків слід використовувати відповідний метод очищення. Будь ласка, переконайтеся, що зразки мають належні чистоту, концентрацію та цілісність ДНК. ДНКазі зустрічаються всюди в лабораторії, тому слід вжити заходів, щоб усунути ризик контамінації. Під час роботи з цією системою переконайтеся, що всі витратні матеріали не містять ДНКаз/РНКаз.

Концентрації праймерів і зондів повинні бути оптимізовані для кожної мішені. Загалом, концентрація праймерів може коливатися у межах 100-1000 нМ, тоді як концентрація зонда може коливатися у діапазоні 50-500 нМ. Після оптимізації рекомендуємо підготувати та зберігати 20-кратну базову суміш праймер-зонд, як описано в наступній таблиці:

	Компонент	Об'єм (мкл)	Кінцева концентрація
1	Прямий праймер, forward primer (100 μM)	2-20	2-20 мкМ
2	Зворотний праймер, reverse primer (100 μM)	2-20	2-20 мкМ
3	Цільовий зонд, probe (100 μM)	1-10	1-10 мкМ
4	ТЕ-буфер (10 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA) або вода, вільна від нуклеаз	Довести до 100 мкл	
	УСЬОГО	100 МКЛ	

Протокол

Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі. Ретельно перемішайте кожен компонент, потім осадіть краплі короткочасним центрифугуванням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджуючий блок.

Кінцевий об'єм реакційної суміші (Master Mix) отримується шляхом множення окремих реакційних об'ємів кожного компоненту на загальну кількість зразків. Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується враховувати додатковий зразок при підрахунку загальної кількості зразків.

Якщо будуть використовуватися окремі олігонуклеотиди, приготуйте майстер-мікс на охолоджуючому блоці (чи льоду) в ПЛР-боксі, як описано в наступній таблиці:

	Компонент	Об'єм (мкл)	Кінцева концентрація
1	DNA qPCR Probe Mix	10	1x
2	Прямий праймер	X	100-1000 нМ
3	Зворотний праймер	Y	100-1000 нМ
4	Зонд	Z	50-500 нМ
5	Вода, вільна від нуклеаз	Довести до 15 мкл	
6	РНК-мішень	5 мкл	< 1 мкг (загальна РНК)
	УСЬОГО	20 мкл	

Якщо використовуватиметься 20-кратна суміш праймер-зонд, приготуйте майстер-мікс на охолоджуючому блоці (чи льоду) в ПЛР-боксі, як описано в наступній таблиці:

	Компонент	Об'єм (мкл)	Кінцева концентрація
1	DNA qPCR Probe Mix	10	1x
2	20x базова суміш праймер/зонд	1	1x
3	Вода, вільна від нуклеаз	4	
4	РНК-мішень	5	< 1 мкг (загальна РНК)
	УСЬОГО	20 мкл	

Рекомендовані умови ампліфікації для одностадійної ПЛР у реальному часі зі зворотною транскрипцією:

Назва етапу	Кількість циклів	Температура	Час
Активация полімерази (Гарячий старт)	1	95°C	2 хв
Ампліфікація	40	95°C	10 сек
		60°C*	20 сек

*Детекція флуоресценції при 60°C

Можливі проблеми та їх вирішення

Проблема	Можлива причина	Рекомендації
Низька ефективність ПЛР	Олігонуклеотиди неспецифічні до мішені	Створити новий дизайн праймерів та зондів
	Неналежне зберігання компонентів набору	Усі компоненти набору слід зберігати при температурі від -25 °C до -15 °C. Слід уникати зберігання при вищих температурах. DNA qPCR Probe Mix не слід заморожувати та розморожувати більше 3-4 разів.
	Не оптимальна температура відпалювання	Емпіричним шляхом підібрати оптимальну температуру
	Неналежне поводження	Переконайтеся, що усі витратні матеріали вільні від ДНКаз/РНКаз
	Залишки етанолу в елюатах	Переконайтеся, що видалили весь залишковий етанол з елюату, оскільки він інгубує ПЛР
	Інгібування ПЛР	Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, можуть призвести до інгібування ПЛР

	Помилки піпетування	Використовуйте тільки повірені чи калібровані дозатори
	Некоректні умови ампліфікації	Перевірте усі умови ампліфікації у програмі
Перехресна контамінація	Повторне використання наконечників	Завжди міняйте наконечники піпетки між переносами рідини (рекомендовано наконечники з аерозольним фільтром)
	Амплікони	Тримайте набір подалі від будь-якого джерела забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктами ампліфікації В ідеалі операції повинні проводитися в трьох окремих зонах (для виділення ДНК/РНК, приготування реагентів для ПЛР, ампліфікації), щоб запобігти контамінації..

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx DNA qPCR Probe Master Mix Kit	100 тестів	IP201912-100
RevoDx DNA qPCR Probe Master Mix Kit	500 тестів	IP201912-500