

RevoDx OneStep qPCR Dye Master Mix Kit

Інструкція із застосування

Для одноетапної ПЛР у реальному часі зі зворотною транскрипцією з флуоресцентним барвником
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:

IP201911-100 – 100 тестів

IP201911-500 – 500 тестів

Склад набору

	Компонент	100 тестів	500 тестів
1	Суміш А (OneStep qPCR Dye Mix A)	900 мкл	5 x 900 мкл
2	Суміш В (OneStep qPCR Dye Mix B)	100 мкл	500 мкл
3	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 OneStep qPCR Dye 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 Суміш А (OneStep qPCR Dye Mix A) 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 OneStep qPCR Dye Master Mix Kit – це набір нового покоління, призначений для виявлення та кількісного визначення РНК. Це набір для ПЛР у реальному часі зі зворотною транскрипцією, що передбачає синтез комплементарної ДНК (кДНК), яка потім ампліфікується. Під час реплікації кДНК в процесі ПЛР, флуоресцентний барвник зв'язується з дволанцюговою ДНК, що зумовлює підвищення рівня флуоресценції. Барвник зумовлює зростання флуоресценції пропорційно концентрації ДНК.

Набір RevoDx OneStep qPCR Dye Master Mix Kit можна використовувати для ампліфікації будь-якої матриці РНК, в тому числі мРНК, тотальної РНК, вірусної РНК для різних цілей, що включають аналіз експресії генів, виявлення мікроорганізмів, визначення вірусного навантаження.

Суміш А (реагент OneStep qPCR Dye Mix A) містить буфер, MgCl₂, dNTPs, флуоресцентний барвник, що зв'язується з дволанцюговою ДНК та стабілізатори/енхансери в оптимальних концентраціях.

Суміш В (реагент OneStep qPCR Dye Mix B) містить суміш ферментів. Набір RevoDx OneStep qPCR Dye Master Mix Kit сумісний для використання з більшістю приладів для ПЛР у реальному часі.

Характеристики набору

- Легке налаштування реакції
- Немає потреби в окремому етапі зворотної транскрипції
- Зменшення можливих помилок на етапі приготування суміші
- Швидкі результати
- 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 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 ЗІЗ.
- На початку та вкінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражуючими розчинами.
- Переконайтесь що усі 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
- РНК-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 РНК, такі як мРНК, загальна РНК і вірусна РНК, можна використовувати як РНК-матрицю. Для екстракції РНК зі зразків слід використовувати відповідний метод очищення. Одноетапний ПЛР-аналіз у реальному часі зі зворотною транскрипцією залежить від якості РНК-матриці. Будь ласка, переконайтеся, що зразки мають належні чистоту, концентрацію та цілісність РНК. РНКази зустрічаються всюди в лабораторії, тому слід вжити заходів, щоб усунути ризик контамінації. Під час роботи з цією системою переконайтеся, що усі витратні матеріали не містять ДНКази/РНКази. Концентрації праймерів повинна бути оптимізована для кожної мішені. Загалом, концентрація праймерів може коливатися у межах 100-1000 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 (100 μM)	2-20	2-20 мкМ
2	Зворотній праймер (100 μM)	2-20	2-20 мкМ
3	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, крім OneStep qPCR Dye Mix B. Компонент OneStep qPCR Dye Mix B тримати на льоду. 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 (суміші для ПЛР А та В та базова суміш праймер-зонд) на загальну кількість зразків. Для уникнення похибок при розкапуванні рекомендується враховувати додатковий зразок при підрахунку загальної кількості зразків. Якщо будуть використовуватися окремі праймери, то приготуйте майстер-мікс на охолоджуючому блоці (чи льоду) в ПЛР-боксі, як описано в наступній таблиці:

	Компонент	Об'єм (мкл)	Кінцева концентрація
1	OneStep qPCR Dye Mix A	9	1x
2	OneStep qPCR Dye Mix B	1	1x
3	Прямий праймер	X	100-1000 нМ
4	Зворотній праймер	Y	100-1000 нМ
5	Вода, вільна від нуклеаз (Nuclease-free Water)	До 15 мкл	
6	РНК матриця	5 мкл	< 1 мкг (загальна РНК)
	УСЬОГО	20 мкл	

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

	Компонент	Об'єм (мкл)	Кінцева концентрація
1	OneStep qPCR Dye Mix A	9	1x
2	OneStep qPCR Dye Mix B	1	1x
3	20x суміш праймерів	1	1x
4	Вода, вільна від нуклеаз (Nuclease-free Water)	4 мкл	
5	РНК матриця	5 мкл	< 1 мкг (загальна РНК)
	УСЬОГО	20 μl	

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

Назва етапу	Кількість циклів	Температура	Час
Синтез кДНК	1	50°C	15 хв
Активация полімерази	1	95°C	2 хв
Ампліфікація	40	95°C	10 сек
		60°C ^a	20 сек

^aДетекція флуоресценції при 60°C

Для визначення специфічності зробіть аналіз кривої плавлення. Дотримуйтесь вказівок виробника ампліфікатора ПЛР для аналізу. Наявність лише 1 піку свідчить про специфічну ампліфікацію, а наявність множинних піків свідчить про неспецифічну ампліфікацію чи утворення димерів праймерів.

Можливі проблеми та їх вирішення

Проблема	Можлива причина	Рекомендації
Низька ефективність ПЛР	Праймери неспецифічні до цільової послідовності	Спроекувати нові праймери
	Неналежне зберігання компонентів набору	Усі компоненти набору слід зберігати при температурі від -25 °C до -15 °C. Слід уникати зберігання при вищих температурах. Реагент OneStep qPCR Dye Mix A не слід заморожувати та розморозувати більше 3-4 разів.
	Неоптимальна температура гібридизації	Емпіричним шляхом підібрати оптимальну температуру
	Неналежне поводження	Переконайтеся що усі витратні матеріали вільні від ДНКази/РНКази
	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
	Похибки піпетування	Використовуйте тільки повірені чи калібровані дозатори

	Неоптимальні умови ПЛР	Перевірте усі умови ампліфікації у програмі
Перехресна контамінація	Повторне використання наконечників	Завжди змінюйте 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) для запобігання контамінації

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx OneStep qPCR Dye Master Mix Kit	100 тестів	IP201911-100
RevoDx OneStep qPCR Dye Master Mix Kit	500 тестів	IP201911-500