

RevoDx OneStep Майстер-мікс RT-qPCR Dye

Інструкція з використання

Набір для одностадійної зворотної транскрипції та ПЛР у реальному часі з флуоресцентним барвником, що зв'язується з дволанцюговою ДНК.

Тільки для професійного використання

Артикул:

IP201911-100 – 100 тестів

Склад набору:

	Компонент	100 тестів
1	OneStep qPCR Dye Mix A	900 мкл
2	OneStep qPCR Dye Mix B	100 мкл
3	Вода, вільна від нуклеаз	1000 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можуть транспортуватися 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. Не допускається зберігання при вищих температурах. За умов дотримання рекомендованих умов зберігання всі компоненти набору залишаються стабільними до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці продукту. OneStep qPCR Dye Mix A не слід піддавати більш ніж 3–4 циклам заморожування-розморожування. За необхідності рекомендується розділити реагент на аліквоти зручного об'єму та зберігати їх при температурі від -25°C до -15°C.

Загальний опис

RevoDx OneStep qPCR Dye Master Mix Kit — це реагент нового покоління, призначений для виявлення та кількісного визначення РНК. Це одностадійний аналіз методом ПЛР у реальному часі зі зворотною транскрипцією, під час якого матриця РНК спочатку перетворюється на комплементарну ДНК (кДНК), після чого відбувається ампліфікація кДНК за участю ДНК-полімерази. Під час реплікації кДНК у процесі ПЛР флуоресцентний барвник, що зв'язується з дволанцюговою ДНК (dsDNA), неспецифічно інтеркалює в дволанцюгову ДНК. Після зв'язування барвника з дволанцюговою ДНК інтенсивність флуоресценції зростає. Інтенсивність флуоресцентного сигналу є пропорційною концентрації ДНК.

RevoDx OneStep qPCR Dye Master Mix Kit може використовуватися для ампліфікації будь-якої РНК-матриці, включаючи мРНК, тотальну РНК і вірусну РНК, для аналізу експресії генів, виявлення мікроорганізмів та визначення вірусного навантаження. OneStep qPCR Dye Mix A містить буфер, MgCl₂, dNTP, флуоресцентний барвник, що зв'язується з дволанцюговою ДНК, а також стабілізатори й підсилювачі реакції в концентраціях, оптимізованих для забезпечення максимальної ефективності реакції. OneStep qPCR Dye Mix B містить ферментний коктейль, оптимізований для забезпечення високої ефективності ампліфікації. RevoDx OneStep qPCR Dye Master Mix Kit оптимізований для використання з більшістю приладів для ПЛР у реальному часі.

Особливості

- Просте налаштування реакції.
- Не потребує окремого етапу зворотної транскрипції.
- Зменшує ймовірність помилок під час підготовки реакції.
- Швидке отримання результатів.
- Висока аналітична чутливість.
- Сумісний із більшістю приладів для ПЛР у реальному часі.

Обмеження щодо використання виробу

- Оскільки експлуатаційні характеристики цього набору не були валідовані для конкретного мікроорганізму, користувач несе відповідальність за підтвердження придатності набору для відповідного спектра застосувань.
- Достовірність результатів залежить від правильності відбору, транспортування, зберігання та обробки зразків.
- Набір призначений виключно для використання кваліфікованим персоналом, який має підготовку з методів молекулярної біології.
- Для досягнення оптимальних результатів дотримуйтесь інструкцій, наведених у цьому керівництві із застосування.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Не змішуйте компоненти наборів із різних серій (LOT).

Інформація з безпеки

- Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні та працювати з ними в лабораторії рівня біологічної безпеки BSL-1 або BSL-2 залежно від виду інфекційного агента.
- Усі відходи, що утворюються під час роботи, слід вважати потенційно інфекційними та утилізувати відповідно до чинних вимог і місцевих нормативних документів.
- Уникайте контакту реагентів набору зі шкірою. У разі контакту ретельно промийте уражену ділянку великою кількістю води.
- Уникайте розливання реагентів та утворення аерозолів.
- Забороняється набирати розчини піпеткою ротом.
- Не вживайте їжу, напої та не паліть у лабораторних приміщеннях.
- Після роботи зі зразками та реагентами ретельно вимийте руки.
- Паспорти безпеки (MSDS) надаються за запитом.
- Під час роботи завжди використовуйте лабораторний халат, одноразові рукавички та захисні окуляри.
- До та після виконання процедури ретельно дезінфікуйте всі робочі поверхні свіжоприготовленим 10% розчином гіпохлориту натрію або дозволеним противірусним дезінфекційним засобом.
- Під час роботи з набором переконайтеся, що всі матеріали та реагенти є вільними від ДНКаз і РНКаз.
- Усі маніпуляції виконуйте відповідно до належної лабораторної практики (GLP) для запобігання перехресній контамінації.
- Використовуйте лише відкалібровані дозатори. Після кожного перенесення рідини змінюйте наконечник. Рекомендується використовувати наконечники з аерозольним фільтром.
- Захищайте набір від будь-яких джерел сторонніх нуклеїнових кислот, особливо ампліфікованих продуктів ПЛР.
- Для запобігання контамінації всі етапи роботи рекомендується виконувати в трьох окремих зонах: виділення ДНК/РНК, постановка ПЛР та ампліфікація.
- Обладнання та витратні матеріали, призначені для окремого етапу роботи, повинні використовуватися лише у відповідній зоні та не переноситися між зонами. Перед переходом до наступної зони необхідно зняти й утилізувати рукавички. Для кожної робочої зони слід використовувати окремий лабораторний халат, який не повинен виноситися за її межі.
- Робочий процес має бути односпрямованим: від зони виділення нуклеїнових кислот до наступних етапів аналізу.

Додаткове обладнання та матеріали

- Праймери до цільової мішені.
- РНК-матриця.
- Прилад для ПЛР у реальному часі.
- Настільна мікроцентрифуга для ПЛР-планшетів або стрип-пробірок.
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 2,0 мл.
- Пробірки, планшети або капіляри для проведення ПЛР у реальному часі.

- Вортекс.
- Засоби індивідуального захисту (лабораторний халат, одноразові рукавички, захисні окуляри тощо).
- Автоматичні дозатори об'ємом 0,5–1000 мкл.
- Наконечники з фільтром, вільні від ДНКаз і РНКаз.
- Мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5 мл, вільні від ДНКаз і РНКаз.

Примітки перед використанням

Як матрицю можна використовувати різні типи РНК, зокрема мРНК, тотальну РНК та вірусну РНК. Для виділення РНК із зразків необхідно застосовувати відповідний метод екстракції. Ефективність одностадійної ПЛР у реальному часі зі зворотною транскрипцією безпосередньо залежить від якості РНК-матриці. Перед початком аналізу необхідно переконатися, що зразки відповідають вимогам щодо чистоти, концентрації та цілісності РНК. РНКазі широко поширені в лабораторному середовищі, тому слід вживати всіх необхідних заходів для запобігання контамінації. Під час роботи з набором переконайтеся, що всі реагенти, матеріали та витратні матеріали є вільними від ДНКаз і РНКаз.

Концентрацію праймерів необхідно оптимізувати для кожної цільової мішені. Загалом рекомендована кінцева концентрація праймерів становить 100–1000 нМ. Після проведення оптимізації рекомендується приготувати та зберігати 20× робочий запас (stock) суміші праймерів відповідно до таблиці, наведеної нижче.

	Компонент	Об'єм (мкл)	Кінцева концентрація
1	Прямий праймер до цільової мішені (100 мкМ)	2-20	2-20 мкМ
2	Зворотний праймер до цільової мішені (100 мкМ)	2-20	2-20 мкМ
3	ТЕ-буфер (10 mM Tris, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) або вода, вільна від нуклеаз	До 100 мкл	
	Усього	100 мкл	

Проведення аналізу

Розморозьте всі компоненти набору, за винятком OneStep qPCR Dye Mix B, при кімнатній температурі. Ретельно перемішайте кожен компонент, після чого короткочасно відцентрифугуйте перед використанням. Перенесіть усі реагенти на лід або охолоджувальний блок. Кінцевий об'єм майстер-міксу розраховується шляхом множення об'єму кожного компонента, необхідного для однієї реакції, на загальну кількість зразків. Для компенсації можливих помилок піпетування рекомендується готувати майстер-мікс із запасом на одну додаткову реакцію.

Якщо використовуються окремі олігонуклеотиди, постановку ПЛР слід виконувати на льоду в ПЛР-боксі відповідно до таблиці, наведеної нижче.

	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 до цільової мішені	X	100-1000 нМ
4	Зворотний праймер до цільової мішені	Y	100-1000 нМ
5	Вода, вільна від нуклеаз	до 15 мкл	
6	Матриця РНК	5 мкл	< 1 мкг (тотальної РНК)
	Усього	20 мкл	

Якщо використовується 20× запасний розчин (stock) суміші праймерів, постановку ПЛР слід виконувати на льоду в ПЛР-боксі відповідно до таблиці, наведеної нижче.

	Компонент	Об'єм (мкл)	Кінцева концентрація
1	OneStep qPCR Dye Mix A	9	1x
2	OneStep qPCR Dye Mix B	1	1x
3	20× запасний розчин (stock) суміші праймерів	1	1x
4	Вода, вільна від нуклеаз	4 мкл	
5	Матриця РНК	5 мкл	< 1 мкг тотальної РНК
	Усього	20 мкл	

Рекомендовані умови проведення одностадійної ПЛР у реальному часі зі зворотною транскрипцією

Етап	Цикли	Температура	Час
Синтез КДНК	1	50 °C	15 хв
Гаряча активація	1	95 °C	2 хв
Ампліфікація ^a	40	95 °C	10 сек
		60 °C ^a	20 сек

^a *Ресстрацію флуоресцентного сигналу слід проводити при 60 °C.*

Виконайте аналіз кривої плавлення для оцінки специфічності ампліфікації. Аналіз кривої плавлення слід проводити відповідно до інструкцій виробника приладу для ПЛР у реальному часі. Наявність одного піка свідчить про специфічну ампліфікацію, тоді як наявність кількох піків вказує на неспецифічну ампліфікацію або утворення димерів праймерів.

Вирішення проблем

Проблема	Можливі причини	Рекомендації
Низька ефективність реакції	Набір олігонуклеотидів не є специфічним до цільової мішені.	Перепроєктуйте праймери.
	Компоненти набору зберігалися неналежним чином.	Усі компоненти набору RevoDx OneStep qPCR Dye Master Mix Kit слід зберігати при температурі від –25 °C до –15 °C. Не допускається зберігання за вищої температури. Компонент OneStep qPCR Dye Mix A не слід піддавати більш ніж 3–4 циклам заморожування-розморозжування.times.
	Температура відпалу не є оптимальною.	Емпірично підберіть оптимальну температуру відпалу для кожного використовуваного набору олігонуклеотидів.
	Неналежне поводження з реагентами.	Під час роботи з цією системою переконайтеся, що все, що використовується, є вільним від ДНКаз і РНКаз.
	Залишковий етанол після очищення.	Переконайтеся, що залишковий етанол повністю видалено з елюату, оскільки він може впливати на результати подальших досліджень.
	Інгібування ПЛР.	Використання плазми або сироватки, отриманих із крові, стабілізованої гепарином, може призводити до інгібування ПЛР.
	Неправильне піпетування.	Використовуйте лише відкалібровані дозатори.
	Неправильно задані умови проведення ПЛР.	Перевірте правильність усіх параметрів циклічного режиму в програмі ампліфікації.
	Повторне використання наконечників дозаторів.	Завжди замінюйте наконечники дозаторів після кожного перенесення рідини (рекомендується використовувати наконечники з аерозольним

Перехресна контамінація.		бар'сром).
	Amplicons	Зберігайте набір подалі від будь-яких джерел контамінації нуклеїновими кислотами, особливо ампліфікованими нуклеїновими кислотами. Для запобігання контамінації всі етапи роботи слід, за можливості, виконувати в трьох окремих робочих зонах (виділення ДНК/РНК, постановка ПЛР, ампліфікація).

Інформація для замовлення

Назва	Фасування	Cat. No.
RevoDx OneStep qPCR Dye Master Mix Kit	100 тестів	IP201911-100

