

RevoDx Майстер-мікс qPCR Probe

Інструкція з використання

Набір для ПЛР у реальному часі з гідролізними зондами для аналізу генотипів, виявлення мікроорганізмів та визначення вірусного навантаження за ДНК-мішенями

Артикул:
IP201912-100
100 тестів

Склад набору

	Компонент	100 тестів
1	DNA qPCR Probe Mix	1000 мкл
2	Вода, вільна від нуклеаз	1000 мкл

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можуть транспортуватися 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. Не допускається зберігання при вищих температурах. За умови дотримання рекомендованих умов зберігання всі компоненти набору залишаються стабільними до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці продукту. DNA qPCR Probe Mix 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 DNA qPCR Probe Master Mix Kit — це реагент нового покоління, призначений для виявлення та кількісного визначення ДНК методом ПЛР у реальному часі. Під час реплікації ДНК у процесі ПЛР гідролізний зонд гібридується з матричною ДНК і розщеплюється завдяки 5'→3'-ендонуклеазній активності ДНК-полімерази *Thermus aquaticus* (Taq) у міру подовження праймера. Розщеплення зонда відбувається лише за умови ампліфікації ДНК, що призводить до просторового розділення флуорофора та гасника (quencher). Продукти ПЛР виявляються шляхом моніторингу зростання інтенсивності флуоресценції, яка експоненціально збільшується з кожним наступним циклом ампліфікації.

RevoDx DNA qPCR Probe Master Mix Kit може використовуватися для ампліфікації будь-якої ДНК-матриці, включаючи геномну, бактеріальну та вірусну ДНК, для проведення генотипування, виявлення мікроорганізмів і визначення вірусного навантаження. DNA qPCR Probe Mix містить буфер, MgCl₂, дезоксирибонуклеозидтрифосфати (dNTP), ферментний коктейль, а також стабілізатори та підсилювачі реакції в концентраціях, оптимізованих для забезпечення максимальної ефективності ампліфікації. RevoDx DNA qPCR Probe Master Mix Kit оптимізований для використання з більшістю приладів для ПЛР у реальному часі.

Особливості

- Просте налаштування реакції.
- Висока швидкість виконання аналізу.
- Зменшення ймовірності помилок під час підготовки реакції.
- Швидке отримання результатів.
- Висока аналітична чутливість.
- Сумісність 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 застосування у відповідній сфері досліджень.
- Достовірність результатів залежить від правильного відбору, транспортування, зберігання та обробки зразків.
- Набір призначений виключно для використання кваліфікованим персоналом, який має підготовку з методів молекулярної біології.
- Для досягнення оптимальних результатів ПЛР дотримуйтеся інструкцій, наведених у цьому керівництві.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Не змішуйте компоненти наборів із різних виробничих серій (LOT).

Інформація щодо безпеки

- Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні. Роботу з ними необхідно проводити в лабораторії рівня біобезпеки BSL-1 або BSL-2 залежно від виду інфекційного агента.
- Усі відходи, що утворюються в процесі роботи, слід вважати потенційно інфекційними та поводитися з ними відповідно до чинних місцевих вимог щодо біологічної безпеки.
- Уникайте контакту реагентів набору зі шкірою. У разі контакту ретельно промийте уражену ділянку водою.
- Уникайте утворення розливів та аерозолів.
- Ніколи не набирайте розчини піпеткою ротом.
- Не вживайте їжу та напої і не паліть у лабораторних приміщеннях.
- Після роботи зі зразками та реагентами ретельно вимийте руки.
- Паспорти безпеки хімічної продукції (MSDS) надаються за запитом.
- Під час роботи завжди використовуйте лабораторний халат, одноразові рукавички та захисні окуляри.
- До початку та після завершення роботи ретельно дезінфікуйте всі робочі поверхні свіжоприготовленим 10% розчином гіпохлориту натрію або дозволеним противірусним дезінфекційним засобом.
- Під час роботи переконайтеся, що всі матеріали та реагенти є вільними від DNase та RNase.
- Дотримуйтеся належної лабораторної практики (GLP) для запобігання перехресній контамінації.
- Використовуйте лише відкалібровані дозатори. Під час кожного перенесення рідини замінюйте наконечник. Рекомендується використовувати наконечники з аерозольним бар'єром (з фільтром).
- Захищайте набір від будь-яких джерел контамінації нуклеїновими кислотами, особливо продуктами ампліфікації.
- Для запобігання контамінації рекомендується виконувати роботи в трьох окремих зонах: виділення ДНК/РНК, підготовка ПЛР-реакції та ампліфікація.
- Обладнання та витратні матеріали, призначені для кожної окремої зони, повинні використовуватися лише в цій зоні та не переноситися між зонами. Перед переходом до наступної зони рукавички необхідно зняти та утилізувати. Для кожної зони слід використовувати окремий лабораторний халат, який не повинен залишати межі відповідної зони.
- Робочий процес повинен здійснюватися лише в одному напрямку: від зони виділення нуклеїнових кислот до зон подальших етапів аналізу.

Додаткове обладнання та матеріали, необхідні для роботи

- Праймери та гідролізні зонди, специфічні до цільової ДНК.
- ДНК-матриця (виділена нуклеїнова кислота).
- Ампліфікатор для ПЛР у реальному часі.
- Настільна мікроцентрифуга для ПЛР-планшетів або стрипованих пробірок.

- Настільна мікроцентрифуга для пробірок об'ємом 2,0 мл.
- ПЛР-планшети, ПЛР-пробірки або капіляри, сумісні з ампліфікатором.
- Вортекс.
- Засоби індивідуального захисту (лабораторний халат, одноразові рукавички, захисні окуляри тощо).
- Автоматичні дозатори об'ємом **0,5–1000 мкл**.
- Наконечники для дозаторів із фільтром, вільні від DNase/RNase.

Зауваження перед використанням

Як матрицю для ПЛР можна використовувати геномну, бактеріальну або вірусну ДНК. Для виділення ДНК зі зразків необхідно застосовувати метод екстракції, який забезпечує отримання нуклеїнових кислот належної якості. Ефективність ПЛР значною мірою залежить від якості виділеної ДНК. Перед постановкою реакції переконайтеся, що зразки мають достатню чистоту, концентрацію та цілісність ДНК. DNase широко поширені в лабораторному середовищі, тому під час роботи необхідно вживати заходів для запобігання деградації ДНК та контамінації. Усі реагенти, витратні матеріали та обладнання повинні бути вільними від DNase та RNase. Концентрації праймерів і гідролізних зондів необхідно оптимізувати для кожної цільової послідовності. Як правило, рекомендована кінцева концентрація праймерів становить 100–1000 нМ, а гідролізних зондів — 50–500 нМ. Після оптимізації рекомендується приготувати та зберігати 20× суміш праймерів і зондів (Primer–Probe Mix) відповідно до таблиці нижче.

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

Порядок виконання

Розморозьте всі компоненти при кімнатній температурі. Ретельно перемішайте кожен компонент на вортексі, після чого короткочасно центрифугуйте. Після цього помістіть усі реагенти на лід або в охолоджувальний блок. Загальний об'єм майстер-міксу розрахуйте, помноживши об'єм кожного компонента для однієї реакції на загальну кількість зразків. Для компенсації можливих похибок дозування рекомендується готувати майстер-мікс із запасом на одну додаткову реакцію. Якщо праймери та зонди додаються окремо, приготуйте реакційну суміш для ПЛР на льоду в ПЛР-боксі відповідно до таблиці нижче.

	Компонент	Об'єм (мкл)	Кінцева концентрація
1	DNA qPCR Probe Mix	10	1x
2	Зворотний праймер до цільової послідовності (100 мкМ)	X	100–1000 нМ
3	Зворотний праймер до цільової послідовності	Y	100–1000 нМ
4	Гідролізний зонд до цільової послідовності	Z	50-500 нМ
5	Вода, вільна від нуклеаз	То 15 мкл	
6	Матрична ДНК	5 мкл	< 1 мкг загальної ДНК
	РАЗОМ	20 мкл	

У разі використання 20× суміші праймерів і зондів реакційну суміш для ПЛР готують на льоду в ПЛР-боксі відповідно до таблиці нижче.

	Компонент	Об'єм (мкл)	Кінцева концентрація
--	-----------	-------------	----------------------

1	DNA qPCR Probe Mix	10	1x
2	20× суміш праймерів і зондів	1	1x
3	Вода, вільна від нуклеаз	4 мкл	
4	Матрична ДНК	5 мкл	< 1 мкг загальної ДНК
	РАЗОМ	20 мкл	

Рекомендовані умови проведення ПЛР у реальному часі:

Етап	Кількість циклів	Температура	Час
Активація ферменту	1	95°C	2 min
Ампліфікація ^a	40	95°C	10 sec
		60°C ^a	20 sec

^a Детекцію флуоресцентного сигналу здійснюють при 60 °C.

Можливі проблеми та способи їх усунення

Проблема	Можливі причини	Рекомендації
Низька ефективність ПЛР	Праймери не є специфічними до цільової послідовності.	Розробіть нові праймери та зонд.
	Компоненти набору зберігалися з порушенням рекомендованих умов.	Усі компоненти набору RevoDx DNA qPCR Probe Master Mix Kit необхідно зберігати при температурі від –25 до –15 °C. Не допускається зберігання при вищих температурах. Майстер-мікс для qPCR з гідролізними зондами (ДНК) не слід піддавати більше ніж 3–4 циклам заморожування-розморожування.
	Не оптимізовано температуру відпалу.	Експериментально визначте оптимальну температуру відпалу для кожного набору праймерів і зондів.
	Порушення правил роботи з реагентами.	Під час роботи з цією тест-системою переконайтеся, що всі реагенти, витратні матеріали та обладнання є вільними від DNase та RNase.
	Залишки етанолу після очищення.	Переконайтеся, що з елюату повністю видалено залишковий етанол, оскільки він може інгібувати подальші етапи аналізу.
	Інгібування ПЛР	Зразки плазми або сироватки, отримані з крові, стабілізованої гепарином, можуть спричиняти інгібування ПЛР
	Неправильне дозування реагентів	Використовуйте лише відкалібровані дозатори
	Неправильні умови проведення ПЛР	Перевірте правильність усіх параметрів програми ампліфікації
Перехресна контамінація	Повторне використання наконечників для дозаторів	Під час кожного перенесення рідини використовуйте новий наконечник для дозатора (рекомендується застосовувати наконечники для дозаторів з аерозольним бар'єром)
	Амплікони	Зберігайте набір подалі від будь-яких джерел контамінуючих нуклеїнових кислот, особливо від ампліфікованих нуклеїнових

		кислот (ампліконів)
		Для запобігання контамінації всі етапи роботи бажано виконувати в трьох окремих зонах: виділення ДНК/РНК, підготовка ПЛР-реакції та ампліфікація

Ordering Information

Назва	Пакування	Cat. No.
RevoDx DNA qPCR Probe Master Mix Kit	100 тестів	IP201912-100

