

RevoDx OneStep Майстер-мікс RT-qPCR Probe

Інструкція із застосування

Набір для одностадійної зворотної транскрипції та ПЛР у реальному часі з гідролізними зондами в одній пробірці.

Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP201910-100 – 100 тестів

Склад набору

Компонент	100 тестів	500 тестів
1 OneStep Суміш для ПЛР А (qPCR Mix A)	900 мкл	5 x 900 мкл
2 OneStep Суміш для ПЛР В (qPCR 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 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 OneStep qPCR 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 Probe Master Mix Kit – це набір з нового покоління, призначений для виявлення та кількісного визначення РНК методом одностадійної ПЛР у реальному часі зі зворотною транскрипцією. При цьому спочатку на матриці РНК здійснюється зворотна транскрипція з утворенням комплементарних ланцюгів ДНК (кДНК), а потім відбувається ампліфікація кДНК за допомогою фермента ДНК-полімерази. Під час реплікації кДНК у ході ПЛР, мічений флуоресцентним барвником зонд гібридується 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 кДНК, 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 OneStep qPCR Probe Master Mix Kit можна використовувати для ампліфікації будь-якої РНК-матриці, включаючи мРНК, загальну РНК і вірусні РНК, для різних цілей, зокрема для генотипування, виявлення мікроорганізмів і визначення вірусного навантаження. OneStep qPCR Mix A містить буфер, MgCl₂, dNTP і стабілізатори/енхансери в концентраціях, розроблених для оптимальної ефективності реакції. OneStep qPCR Mix B містить суміш ферментів, оптимізовану для досягнення найкращих результатів. RevoDx OneStep 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
- 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.
- Поводьтеся 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 кожену 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
- 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. РНКазиди 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/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 (100 μМ)	2-20	2-20 мкМ
2	Зворотний праймер, reverse (100 μМ)	2-20	2-20 мкМ
3	Цільовий зонд, probe (100 μМ)	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, крім OneStep qPCR Mix B. Компонент OneStep qPCR 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 розрахуванні 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:

	Назва компонента	Об'єм (мкл)	Кінцева концентрація
1	OneStep Суміш для ПЛР А	9	1x
2	OneStep Суміш для ПЛР В	1	1x
3	Прямий праймер	X	100-1000 нМ
4	Зворотний праймер	Y	100-1000 нМ
5	Зонд	Z	50-500 нМ
6	Вода, вільна від нуклеаз	Довести до 15 мкл	
7	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:

	Назва компонента	Об'єм (мкл)	Кінцева концентрація
1	OneStep Суміш для ПЛР А	9	1x
2	OneStep Суміш для ПЛР В	1	1x
3	20x базова суміш праймер/зонд	1	1x
4	Вода, вільна від нуклеаз	4	
5	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
Синтез кДНК	1	50°C	15 хв
Активация полімерази	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. OneStep qPCR Mix A не слід заморожувати та розморозувати більше 3-4 разів.
	Не оптимальна температура відпалювання	Емпіричним шляхом підібрати оптимальну температуру
	Неналежне поводження	Переконайтеся що усі витратні матеріали вільні від ДНКази/РНКаз
	Залишки етанолу в елюатах	Переконайтеся, що видалили весь залишковий етанол з елюату, оскільки він інгубує ПЛР
	Інгібіція ПЛР	Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, можуть призвести до інгібіції 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 OneStep qPCR Probe Master Mix Kit	100 тестів	IP201910-100