

EasyJOE Multiplex Master Mix

EasyJOE Multiplex Master Mix pozwala na amplifikację w czasie rzeczywistym jednej lub wielu sekwencji docelowych, w łatwym w użyciu formacie One Step RT-qPCR Probe Master Mix, w trybie szybkim (ang. *fast mode*) lub ze standardowymi ustawieniami termocyklera.

EasyJOE Multiplex Master Mix zawiera odwrotną transkryptazę i polimerazę DNA, co pozwala na amplifikację DNA i RNA. Startery i sondy kontrolne są zawarte w mieszaninie reakcyjnej w celu identyfikacji kontroli wewnętrznej RNA (Nr kat. E0833) oraz kontroli wewnętrznej DNA (Nr kat. E0834). Wewnętrzne kontrole RNA/DNA są dostępne oddzielnie. Sonda do wykrywania wewnętrznej kontroli jest znakowana barwnikiem JOE™ i analizowana w kanałach JOE™/HEX™/VIC®.

EasyJOE Multiplex Master Mix zawiera pasywny barwnik referencyjny ROX umożliwiający normalizację fluorescencji w urządzeniach Applied Biosystems, w tym Applied Biosystems 7500, ViiA™7 oraz QuantStudio™Systems. EasyJOE Multiplex Master Mix jest kompatybilny z urządzeniami niewymagającymi barwnika ROX, w tym Rotor-Gene® Q oraz Bio-Rad CFX96™.

	Nr kat. E0832-01 100 reakcji	Nr kat. E0832-02 1 000 reakcji
EasyJOE Multiplex Master Mix	1,5 ml	10 x 1,5 ml

Przechowywanie

- Zestaw należy przechowywać w temperaturze -20°C i zabezpieczyć przed kontaminacją RNA i DNA.
- Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania (>2), ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji. Odczynnik należy zamrozić w mniejszych porcjach, jeśli jest używany tylko sporadycznie.
- Pozytywną kontrolę należy przechowywać oddzielnie.

Kontrola wewnętrzna

Kontrola wewnętrzna używana jako kontrola izolacji lub amplifikacji jest dostępna oddzielnie jako IC-RNAJOE (Nr kat. E0833) i IC-DNAJOE (Nr kat. E0834). Kontrola wewnętrzna pozwala monitorować obecność inhibitorów w reakcji PCR lub innych problemów związanych z izolacją, odczynnikami albo błędami urządzeń.

- Dodać 5 µl IC-DNAJOE lub IC-RNAJOE do każdej izolacji do buforu lizującego przed oczyszczeniem kwasów nukleinowych, aby wykorzystać jako kontrolę izolacji.
- Dodać 0,5 µl IC-DNAJOE lub IC-RNAJOE do reakcji PCR, aby wykorzystać jako kontrolę amplifikacji.

This product is developed, designed and sold exclusively for in vitro use only.

Barwnik referencyjny ROX

Pasywny barwnik referencyjny ROX, obecny w **EasyJOE Multiplex Master Mix**, umożliwia normalizację fluorescencji w niektórych cyklerach. Wykorzystanie barwnika ROX jest wymagane we wszystkich cyklerach PCR w czasie rzeczywistym z Applied Biosystems i opcjonalnie w cyklerach Agilent. Barwnik ROX kompensuje zmiany sygnału fluorescencji między studzienkami, wynikające z niewielkich różnic w objętości reakcji. ROX nie bierze udziału w reakcji PCR i nie zakłóca reakcji PCR w czasie rzeczywistym w żadnym termocyklerze.

Przygotowanie próbek

RNA z wymazu, śliny, wydzieliny lub z próbki środowiskowej powinno być izolowane za pomocą zestawu do oczyszczania RNA. Należy postępować zgodnie z instrukcją producenta.

Środki ostrożności

Należy chronić **EasyJOE Multiplex Master Mix** i przygotowany **master mix** przed bezpośrednim wpływem światła, ponieważ sondy są wrażliwe na degradację. Zaleca się stosowanie przezroczystych fiolek i probówek, aby umożliwić kontrolę wizualną, w celu zapewnienia prawidłowego wymieszania.

Protokół

Przygotować reakcję zgodnie z poniższą tabelą. Trzymać wszystkie odczynniki na lodzie aż do czasu umieszczenia próbek w termocyklerze.

Składnik reakcji:	Ilość:
EasyJOE Multiplex Master Mix	15 µl
Startery i sondy*	2 µl
Matryca**	X µl
RNase-free Water	do 25 µl

*Zalecane jest stosowanie starterów w stężeniu końcowym od 400 do 800 nM oraz sondy w stężeniu końcowym 200 nM na reakcję.

**W celu kontroli amplifikacji, dodać odpowiednią ilość IC-DNA/RNAJOE do mieszaniny reakcyjnej i odpowiednio dostosować objętość reakcji lub nieznacznie przekroczyć objętość reakcji.

EasyJOE Multiplex Master Mix jest przeznaczony do pracy w trybie *fast mode*.

Uruchomić program termocyklera zgodnie z tabelą:

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Odwrotna transkrypcja*	50°C	10 min	1
Denaturacja wstępna	95°C	2 min	1
Denaturacja	95°C	5 s	40-45
Przyłączanie starterów/ wydłużanie	60°C	30 s	
Chłodzenie	4°C	∞	1

*Pomiąć ten etap, gdy jako matryca zostało użyte DNA.

Czas denaturacji oraz czas i temperaturę przyłączania/wydłużania starterów można dostosować do specyficznej metodologii danego laboratorium. Należy dokładnie sprawdzić wykres amplifikacji dostosowując wartości podstawowe i progowe, jeśli to konieczne. Sekwencja docelowa i/lub kontrola wewnętrzna powinny ulegać amplifikacji w każdej reakcji PCR. Jeśli zarówno docelowa sekwencja, jak i kontrola wewnętrzna nie ulegną amplifikacji, należy powtórzyć eksperyment.