



YOUSEQ

UŽIVATELSKÁ PŘÍRUČKA K SOUPRAVĚ PRO KVANTIFIKACI LIDSKÉ GENOMOVÉ DNA

CAT NO. YSL-qP-HugDNA-100

100 reakcí
S lyofilizovanou směsí MasterMix

VERZE 2.0

Pouze pro výzkumné účely



YOUSEQ

YouSeq Ltd
8 Moorside Place
Moorside Road
Winchester SO23
7FX
Spojené království

+44 333 577 6697
hello@youseq.com

youseq.com

URČENÉ POUŽITÍ

Tento produkt je testovací souprava qPCR pro kvantifikaci veškerého lidského genomového materiálu přítomného v reakci. Primery/sondy jsou uvedeny *in silico pro* detekci všech veřejně dostupných sekvencí lidského genomu a žádných jiných cílů.

OBSAH SADY

	Barva čepice	Svazek
Cílově specifický primer/sonda (FAM sonda)		110 µl
Standard lidské gDNA		100 µl *
Lyofilizovaná směs Tetra 2X qPCR MasterMix		1,1 ml *
Resuspenzní pufr MasterMix		1,5 ml
Pufr pro resuspenzi šablony		1,5 ml
Voda bez DNázy/RNázy		1,5 ml

* Dodává se lyofilizovaný a vyžaduje resuspenzi, viz níže uvedený krok resuspenze.

KROK RESUSPENZE

Obsah soupravy znovu rozpustíte pomocí správných činidel podle níže uvedené tabulky. Roztočte nebo jemně poklepejte na všechny zkumavky a lahvičky, abyste se ujistili, že je veškerý obsah na dně zkumavky. Po přidání resuspenzního činidla zkumavky znovu promíchejte nebo roztočte, abyste se ujistili, že je dobře promícháno.

	Reagencie	Svazek
Standard lidské gDNA	Pufr pro resuspenzi šablony	100 µl
Lyofilizovaná směs Tetra 2X qPCR MasterMix	Resuspenzní pufr MasterMix	1,1 ml

POŽADOVANÉ, ALE NEPOSKYTOVANÉ MATERIÁLY

Souprava pro extrakci genomové DNA - Tato souprava bude dobře fungovat s jakoukoli soupravou pro extrakci DNA, která poskytuje vysoce kvalitní DNA s minimem přítomných inhibitorů PCR.

qPCR přístroj s minimálně 1 barevnou detekcí (FAM). Pipety a obecné laboratorní vybavení.

qPCR BENCH SIDE PROTOKOL

Před použitím očistěte a dekontaminujte všechny pracovní plochy, pipety a další vybavení, abyste odstranili potenciální kontaminaci nukleových kyselin.

Zkombinujte následující činidla a vytvořte konečnou testovací reakci:

Komponenta	Svazek
Tetra 2X qPCR MasterMix	10 μ l
Směs primerů a sond specifická pro daný cíl	1 μ l
Voda bez DNázy/RNázy	4 μ l
Vzorek DNA	5 μ l
Závěrečný svazek	20 μ l

Upozornění: Reakční destičku qPCR připravte na ledu a rychle přejděte k amplifikaci. Delší inkubace reakční směsi, zejména při pokojové teplotě, může snížit citlivost testu.

NEGATIVNÍ KONTROLA

Pro negativní kontrolní reakci zopakujte výše uvedenou reakci a nahraďte DNA vzorku vodou bez RNázy/DNázy.



Upozornění: Než přejdete ke kroku pozitivní kontroly, nezapomeňte uzavřít jamky pro vzorek a negativní kontrolu.

POZITIVNÍ KONTROLNÍ STANDARDY

V prostředí určeném pro post-PCR proveďte sériové ředění standardu lidské gDNA a vytvořte šestibodovou standardní křivku.

- Do 5 zkumavek přidejte 30 μ l resuspenzního pufru pro templát a označte je 2, 3, 4, 5 a 6.
- Do zkumavky 2 napipetujte 10 μ l standardu gDNA.
- Promíchejte pipetováním 5krát nahoru a dolů.
- Vyměňte pipetovací špičku a napipetujte 10 μ l ze zkumavky 2 do zkumavky 3.
- Promíchejte pipetováním 5krát nahoru a dolů.

Opakujte kroky 4 a 5 se zbývajících zkumavkami, abyste dokončili proces ředění

Podle níže uvedené tabulky vytvořte reakční jamku pro každý bod standardní

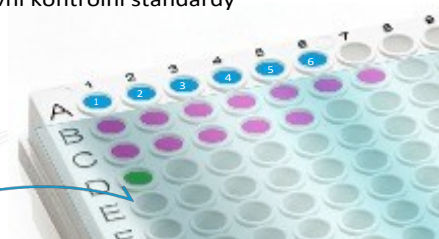
křivky:

Komponenta	Svazek
2X qPCR MasterMix	10 μ l
Cílová směs primerů a sond	1 μ l
Voda bez DNázy/RNázy	4 μ l
Vybrané ředění standardu gDNA	5 μ l
Závěrečný svazek	20 μ l

Popsaná standardní křivka poskytuje dynamický rozsah podle níže uvedené tabulky:

Trubka č.	Počet pg/ μ l v PCR reakci
Trubka 1	5,000
Trubka 2	1,250
Trubka 3	312
Trubka 4	78
Trubka 5	19
Trubka 6	5

Pozitivní kontrolní standardy
1-6



Ostatní vrty
zapečetěné, aby
nedošlo ke
kontaminaci

PROTOKOL AMPLIFIKACE qPCR

Tato sada YouSeq funguje s jakýmkoli qPCR přístrojem schopným detekovat FAM. Použijte následující podmínky cyklování:

	Teplota	Čas
	95°C	3 minuty
45 cyklů	95	°C15 sekund
	60°C*	60 sekund

*Sběr dat pro příslušné cílové kanály - FAM

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Standardy gDNA

Nejprve zkontrolujte výkonnost norem. První bod vaší standardní křivky by měl amplifikovat v rozmezí Cq přibližně 27+/- 3. Zesílení mimo tento rozsah naznačuje selhání a test by se měl opakovat.

Aby bylo možné vzorky spolehlivě kvantifikovat, musí standardní křivka dosahovat účinnosti mezi 90 % a 110 %. Tuto hodnotu automaticky vypočítá váš analytický software. Pokud se dostane mimo toto rozmezí, měl by se běh opakovat s čerstvě připravenou standardní křivkou.

Negativní kontrola

Za ideálních okolností by negativní kontrolní jamka měla poskytovat rovnou linii - negativní výsledek. Nezřídka se však stává, že laboratorní kontaminace pozadí způsobí velmi pozdní signál. Pokud je tento signál vzdálen ≥ 5 hodnot Cq od signálu vašeho vzorku, lze jej považovat za negativní a výsledek je životaschopný.

Pokud se negativní kontrola liší od výsledku vzorku o <5 Cq, je výsledek neprůkazný a test je třeba opakovat.

Pozitivní vzorky

Vzorky, které jsou pozitivní na hugDNA, budou mít definovaný "sigmoidální" amplifikační diagram. Software vašeho qPCR přístroje vypočítá kvantitativní výsledek pro tyto signály porovnáním signálu se standardní křivkou pozitivní kontroly.

Přehledná interpretace výsledků:

	Signál qPCR				
Lidské vzorky gDNA	+	-	+/-	+/-	+/-
Standard	+	+	+/-	+	-
Negativní kontrola	-	-	≤ 33	>33	+/-
Výsledek	Kvantitativní výsledek	Negativní výsledek	Neúspěšný test (kontaminace)	Viz výše uvedená negativní rada ctrl	Neúspěšný test

KVANTIFIKACE GENOMOVÉ DNA VZORKU

Software vašeho qPCR přístroje automaticky porovná hodnoty C_q získané z vašich vzorků s hodnotami ze standardů lidské gDNA v sadě. Tento výpočet poskytne "vypočtenou koncentraci" v ng/μl každého z vašich vzorků gDNA.

Pokyny naleznete v softwaru přístroje qPCR.

Pokud se koncentrace vzorku dostane mimo dynamický rozsah standardů, zřeďte vzorek a zkuste běh zopakovat.

SPECIFIKACE PRODUKTU

Uložení soupravy

Skladujte při -20C. Sada je uchovávána ve zmrazeném stavu a má trvanlivost 12 měsíců.

Po přípravě standardní křivky lidské gDNA ji lze uchovávat ve zmrazeném stavu. Pokud však v průběhu času pozorujete posun hodnot C_q na standardní křivce, je třeba připravit novou standardní křivku.

Použijte kvalitní gDNA

Nekvalitní vstupní nukleová kyselina je největší příčinou selhání testu. Souprava bude dobře fungovat s jakýmkoli zdrojem kvalitní gDNA. Dobrá kvalita je definována jako gDNA s vysokou integritou (nedegradovaná) a s nízkými hladinami přítomných inhibitorů.

Regulační status

Tento produkt byl vyvinut pouze pro výzkumné účely a není určen pro diagnostické použití. Neměl by být používán k diagnostice onemocnění, pokud není výslovně schválen regulačními orgány v zemi použití.

Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení kvality společnosti YouSeq Ltd certifikovaným podle normy ISO EN 13485 je každá souprava testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna stálá kvalita výrobku.

Technická pomoc

Pro zákaznickou podporu se obraťte na:

e-mail: support@youseq.com
telefon: +44 (0)333 577 6697