



YOUSEQ

UŽIVATELSKÁ PŘÍRUČKA KE KVANTIFIKAČNÍ SADĚ NGS

CAT NO. YS-NGS-LQC-IL-96/384/960

96, 384 nebo 960 reakcí (pro knihovny Illumina)

VERZE 5.0

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





OBSAH

| | |
|---|---|
| URČENÉ POUŽITÍ | 3 |
| OBSAH SADY | 3 |
| RESUSPENSION | 3 |
| POŽADOVANÉ, ALE NEPOSKYTOVANÉ MATERIÁLY | 3 |
| NASTAVENÍ reakce qPCR..... | 4 |
| ŘEDĚNÍ KNIHOVNY | 4 |
| POZITIVNÍ KONTROLA | 5 |
| NASTAVENÍ STANDARDNÍ KŘIVKY | 5 |
| PROTOKOL AMPLIFIKACE qPCR..... | 6 |
| INTERPRETACE DAT | 6 |
| ANALÝZA DAT qPCR..... | 6 |
| KVANTIFIKACE KNIHOVEN | 7 |
| SPECIFIKACE PRODUKTU | 7 |

ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Sada pro kvantifikaci knihoven YouSeq NGS umožňuje uživatelům kvantifikovat jejich knihovny NGS. Pomocí této sady lze kvantifikovat všechny knihovny vytvořené pomocí adaptérových sekvencí Illumina P5/P7.

OBSAH SADY

| | Barva čepice | 96 rxns | 384 rxns Objem | 960 rxns Objem |
|---|---|-------------|----------------|----------------|
| Kvantifikační sada primerů pro knihovny NGS |  | 110 µl | (4x) 110 µl | (10x) 110 µl |
| YouSeq qPCR SYBR green MasterMix |  | 1 ml | (4x) 1 ml | (10x) 1 ml |
| Standardy 1-4* |  | (4x) 100 µl | (16x) 100 µl | (40x) 100 µl |
| Ředící pufr YouSeq** |  | (1x) 50 ml | (4x) 50 ml | (10x) 50 ml |
| Voda bez DNázy/RNázy |  | 1,5 ml | (4x) 1,5 ml | (10x) 1,5 ml |

* Dodává se lyofilizovaný a před použitím vyžaduje resuspenzi, viz níže uvedené pokyny k resuspenzi.

** Po rozmrazení lze skladovat při teplotě 2-8 °C pro další použití.

RESUSPENSION

Resuspendujte určený obsah soupravy se správnými činidly podle níže uvedené tabulky. Před otevřením lahvičky roztočte nebo na ně jemně poklepejte, abyste se ujistili, že je veškerý obsah na dně.

Po přidání resuspenzního činidla každou lahvičku pulzně promíchejte, abyste zajistili její dobré promíchání.

| | Reagencie | Přidání objemu |
|-------------------|--------------------|----------------|
| Šablona norem 1-4 | Ředící pufr YouSeq | 100 µl |

POŽADOVANÉ MATERIÁLY, ALE NE

přístroj qPCR

Pipety, mikrocentrifugační zkumavky a obecné laboratorní vybavení

NASTAVENÍ reakce qPCR UP

Reakci nastavte na led. Při vytváření reakční směsi postupujte podle níže uvedené tabulky.

- i. N = 1x ředění vzorku PLUS 4x standardy PLUS 1x kontrola bez šablony (NTC) = 6
- ii. Při výpočtu se použije překročení (N + 1) = 7

Každá reakce vyžaduje, aby se do každé jamky vložily níže uvedené objemy komponent. Doporučuje se připravit hromadnou směs a dávkovat ji do všech příslušných jamek. Níže je uveden výpočet potřebného množství směsi včetně přebytku.

| Komponenta | Požadovaný objem | |
|--------------------------------|------------------|---------------|
| | Na studnu | 7 x rxn vol |
| YouSeq qPCR MasterMix | 10 µl | 70 µl |
| Knihovnický specifické primery | 1 µL | 7 µL |
| Voda bez DNázy/RNázy | 4 µL | 28 µL |
| Celkový objem | 15 µl | 105 µl |

KNIHOVNA ŘEDĚNÍ

Provedte sériové ředění sdružené knihovny, abyste vytvořili knihovní produkt o optimální koncentraci.

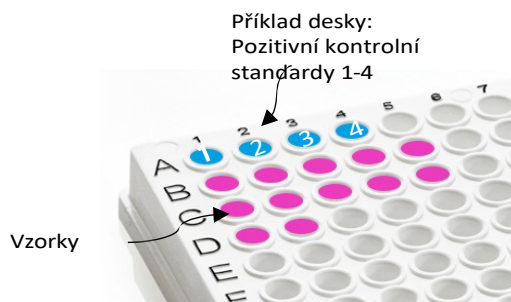
1. Přidejte 99 µl ředícího pufru do 2 zkumavek a označte je "zkumavka 2" a "zkumavka 3".
2. Do zkumavky přidejte 90 µl ředícího pufru a označte ji "zkumavka 4".
3. Do zkumavky 2 odpipetujte 1 µl přečištěné knihovny.
4. Promíchejte pipetováním 5krát nahoru a dolů.
5. Vyměňte špičku pipety a napipetujte 1 µl ze zkumavky 2 do zkumavky 3.
6. Promíchejte pipetováním 5krát nahoru a dolů.
7. Vyměňte pipetovací špičku a napipetujte 10 µl ze zkumavky 3 do zkumavky 4.
8. Promíchejte pipetováním 5krát nahoru a dolů.

| Trubka č. | Faktor ředění |
|-----------|---------------|
| 4 | 1 : 100,000 |

9. Pipetujte 5 µl zkumavky 4 do určených jamek na desce qPCR.

POZITIVNÍ KONTROLA

Do určených jamek napipetujte 5 μ l každého pozitivního kontrolního standardu, abyste vytvořili pozitivní kontrolní standardní křivku.

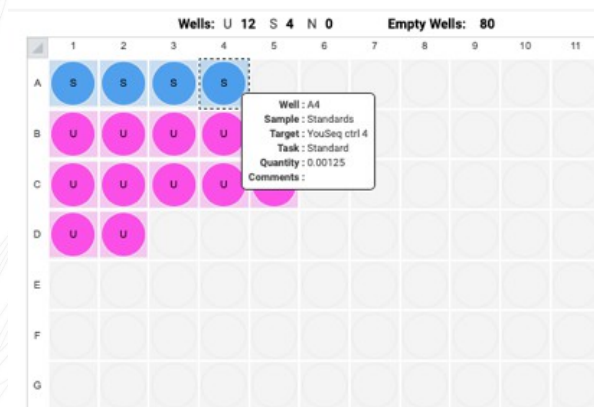


Destičku pečlivě uzavřete a krátce ji roztočte v destičkové odstředivce, aby se všechna činidla dostala na dno jamky. Vložte destičku do přístroje qPCR.

NASTAVENÍ STANDARDNÍ KŘIVKY UP

Naprogramujte standardní křivku do softwaru přístroje qPCR se vstupními koncentracemi podle níže uvedené tabulky:

| Standardní č. | Koncentrace |
|---------------|-------------|
| 1 | 110 pM |
| 2 | 0,5 pM |
| 3 | 0,025 pM |
| 4 | 0,00125 pM |



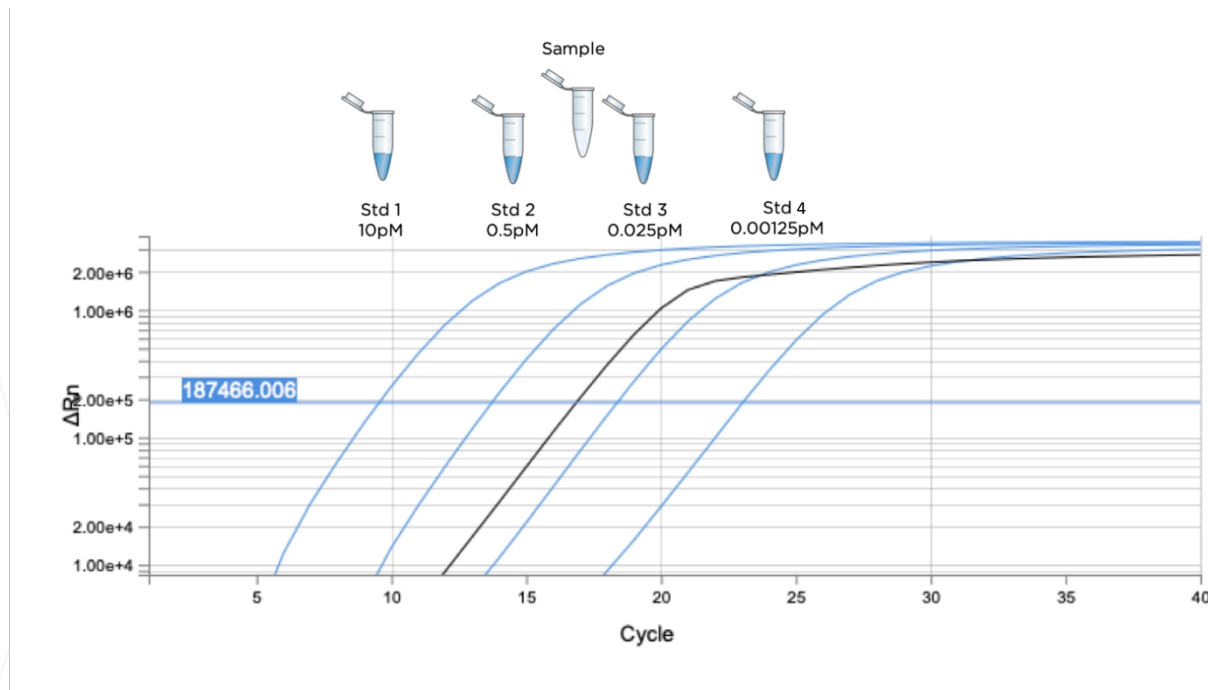
qPCR AMPLIFIKACE PROTOKOL

Provedte PCR za následujících podmínek cyklování:

| | Teplota | Čas |
|-------------|----------|-----------|
| Horký start | 95°C | 3 minuty |
| 40 cyklů | 95°C | 10 sekund |
| | 60°C* | 60 sekund |
| Křivka tání | 55-95°C* | |

*Ujistěte se, že během těchto kroků sbíráte fluorogenní data prostřednictvím kanálu FAM/SYBR (zelený).

INTERPRETACE DAT



Software vašeho qPCR přístroje přesně vypočítá koncentraci vaší knihovny porovnáním hodnoty Cq z vaší knihovny s hodnotami Cq standardní křivky. Tuto koncentraci pečlivě zdokumentujte ve svých záznamech.

qPCR DATA ANALÝZA

Aby bylo zajištěno, že qPCR proběhla dostatečně a poskytla přesné kvantifikační hodnoty, musí být posouzena a splněna následující kritéria:

- Účinnost PCR - 90 - 110% účinnost
- Standardní hodnota Cq by měla být v rozmezí 9,2 +/- 1 Cq.

Nejsou-li kritéria splněna, nelze být použito pro správnou kvantifikaci a je třeba je opakovat. **Upozornění:**

prahová hodnota by měla být ručně nastavena na 10 % celkové RFU standardů 10 pM.

KVANTIFIKACE KNIHOVEN

Software přístroje qPCR automaticky porovná hodnoty C_q získané ze vzorků s hodnotami pozitivních kontrolních standardů v sadě. Tento výpočet poskytne "vypočtenou koncentraci" v pM pro každou z nařaděných knihoven NGS.

Chcete-li určit koncentraci knihovny pro neřaděnou knihovnu, proveďte výpočet pro každou knihovnu podle níže uvedeného vzorce:

Pracovní příklad:

Knihovna byla před qPCR nařaděna v poměru 1:100 000 a získala vypočtenou koncentraci 0,6 pM s průměrnou délkou fragmentu 370 bp. Upravená koncentrace = $0,6 \times (252 / 370) \times 100\,000$

Upravená koncentrace = 40864 pM nebo 40,864 nM

SPECIFIKACE PRODUKTU

Uložení soupravy

Od příjezdu skladujte při -20 °C. Primery a MasterMix by měly být během používání uchovávány na ledu.

Laboratorní postupy

Aby se zabránilo kontaminaci reakcí a pracovního prostoru, je třeba vždy dodržovat správnou molekulární praxi. Před zahájením protokolu vyčistěte pracovní prostory a vybavení pomocí přípravku DNA Away nebo 7% bělicího roztoku.

Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení kvality společnosti YouSeq Ltd certifikovaným podle normy ISO EN 13485 je každá šarže soupravy The ONE 16S NGS Library Preparation testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna stálá kvalita produktu.

Technická pomoc

V případě zájmu o zákaznickou podporu nás prosím kontaktujte:

e-mail: support@youseq.com

Telefon: +44 (0)333 577 6697

Ochranné známky a prohlášení o vyloučení odpovědnosti YouSeq®, Illumina

Registrované názvy, ochranné známky apod. použité v tomto dokumentu, i když nejsou výslovně takto označeny, nelze považovat za nechráněné zákonem.

Není k dispozici ve všech zemích
© 2021 YouSeq Ltd, všechna práva vyhrazena.