



EliZyme[™] Library Quantification Kit

Účel použití:

Produkt je určen pouze pro vědecké účely, nikoliv pro diagnostické procedury.

Skladování:

Skladujte při -20 °C a vyhněte se dlouhotrvajícímu vystavování světelnému záření. Při dodržení těchto skladovacích podmínek si kit plně udrží svou aktivitu až do vypršení expirační doby uvedené na kitu.

Úvod

Klíčovou roli v sekvenování nové generace sehrává přesná kvantifikace knihovny. Při sestavování knihovny mohou odchylky v koncentracích mezi vzorky vést k rozdílům v počtu sekvenovaných readů. Nízká koncentrace knihovny může způsobit také nízkou hustotu clusterů. Naopak velká koncentrace knihovny může zapříčinit příliš vysokou hustotu clusterů, která může vést k jejich nedostatečnému rozlišení. Oba případy mají za následek nízkou kvalitu dat.

Popis produktu

EliZyme[™] Library Quantification Kit je založen na qPCR metodě. EliZyme[™] Library Quantification Kit pro Illuminu[®] obsahuje všechny reagentie nezbytné pro úspěšnou kvantifikaci knihovny. Kvantifikace knihovny je realizována amplifikací předem naředěných DNA standardů a naředěných vzorků knihovny. Primery rozpoznají adaptorové sekvence používané v sekvenování nové generace na zařízeních společnosti Illumina[®]. Průměrná hodnota C_t každého DNA standardu je vynesena do grafu proti koncentraci v pM (v logaritmickém měřítku). Je tak generována křivka používaná pro výpočty koncentrace knihovny.

Obsah

	Kat. číslo	Obsah balení	Velikost balení
EliZyme [™] Library Quantification Kit	EZ4815	500/1000 rxns (10 µl nebo 20 µl reakce)	2x EliZyme [™] qPCR Mix (5 ml) Primer Mix (1 ml) DNA Standardy 1-5 (Kat. číslo DNAS, 80 µl) ROX Additive (100 µl)



Komponenty	Koncentrace
DNA Standard 1	20 pM
DNA Standard 2	2 pM
DNA Standard 3	0,2 pM
DNA Standard 4	0,02 pM
DNA Standard 5	0,002 pM
Primer Mix	10x Primer Premix
2x EliZyme™ qPCR Mix	2x Reakce
ROX Additive	50 µM

Složení reakční směsi

Před použitím musí být všechny reagensie rozmrazeny a krátce zvortexovány a zcentrifugovány. Přesvědčte se, že jsou DNA standardy skutečně zcela rozmrazeny. Nerozmražené DNA standardy mohou vést k špatnému odečtu kalibrační křivky, což má za následek nepřesné stanovení koncentrace knihovny.

Pro odlišné Real-Time PCR cykly jsou požadovány odlišné koncentrace pasivní ROX reference. Přímě do 5 ml zkumavky s 2x EliZyme™ qPCR mixem je přidán 50 µM ROX Additive. Zkontrolujte svůj přístroj pro přidání pasivního referenčního barviva. Po přidání ROX mohou být reagensie okamžitě použity nebo skladovány v -20 °C. Pro přidání správného množství ROX použijte následující tabulky.

Pro NO-ROX cykly

Reagensie		20 µl rxn	10 µl rxn
2x EliZyme™ qPCR Mix	5,0 ml	Master Mix 12 µl	Master Mix 6 µl
Primer Mix	1,0 ml	+ PCR voda 4 µl	+ Vzorek 4 µl*
		+ Vzorek 4 µl*	

*DNA Standard, naředěná knihovna nebo PCR voda

Pro Low-ROX cykly

Reagensie		20 µl rxn	10 µl rxn
2x EliZyme™ qPCR Mix	5,0 ml	Master Mix 12 µl	Master Mix 6 µl
Primer Mix	1,0 ml	+ PCR voda 4 µl	+ Vzorek 4 µl*
ROX Additive	10,0 µl	+ Vzorek 4 µl*	

*DNA Standard, naředěná knihovna nebo PCR voda



Pro High-ROX cykly

Reagencie		20 µl rxn	10 µl rxn
2x EliZyme™ qPCR Mix	5,0 ml	Master Mix 12 µl	Master Mix 6 µl
Primer Mix	1,0 ml	+ PCR voda 4 µl	+ Vzorek 4 µl*
ROX Additive	100,0 µl	+ Vzorek 4 µl*	

*DNA Standard, naředěná knihovna nebo PCR voda

Příprava vzorku

Vhodně naředte knihovnu. Koncentrace naředěné knihovny se musí pohybovat v rozsahu kalibrační křivky. Vyhněte se extrémně velkému ředění. Místo jednoho ředění použijte 2 postupná ředění (např.: použijte dvě 1/100 ředení místo 1/10 000 ředení). Pro každou kvantifikaci použijte čerstvě naředěnou knihovnu.

Je doporučeno uskutečnit qPCR pro DNA standardy, vzorky knihovny a kontroly v triplicátu. Pro každý běh použijte jako negativní kontrolu PCR vodu. C_t hodnoty negativních kontrol by měly být získány minimálně o 3 cykly později než průměrné C_t hodnoty 5. standardu.

PCR protokol

Krok	Teplota	Čas	Cykly
Iniciace denaturace	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	10 s	35
Annealing/Extenze	60 °C	30 s*	
Melt curve analysis**	65 °C – 95 °C		

*Pro amplikony delší než 700 bp zvýšte na 90s.

**Analýza křivky tání je účinným nástrojem k detekci adapter-dimer komplexů v knihovně nebo k detekci kontaminace.

Analýza dat

K určení koncentrace knihovny použijte kalibrační křivku. Přesvědčte se, že kalibrační křivka má hodnotu $R^2 \geq 0,99$, efektivnost amplifikace je mezi 80 – 120 % a průměrná ΔC_t hodnota se nachází mezi 3,2 – 4,2. Pokud kalibrační křivka nesplňuje tato kritéria, kvantifikace knihovny nemusí být přesná.

Pokud je průměrná C_t hodnota zředěné knihovny nižší než hodnota DNA Standardu 1 nebo vyšší než hodnota DNA Standardu 5, vyřadte jej. Použijte přiměřené ředění knihovny. Koncentrace by měla spadat do mezí kalibrační křivky.



Při výpočtu koncentrace knihovny, použijte průměrnou hodnotu C_t konkrétního ředění. Pokud do kalibrační křivky spadá pouze jediné ředění knihovny, použijte tuto hodnotu koncentrace. Koncentrace musí být upravena s přihlédnutím k průměrné cílové délce knihovny. Pro výpočet upravené koncentrace vynásobte průměrnou naměřenou koncentraci následujícím podílem:

Délka DNA Standardu (447bp)/Průměrná délka fragmentů knihovny v bp

Vynásobte upravenou koncentraci ředícím faktorem pro každou použitou knihovnu. Vypočtené koncentrace použijte pro sestavení výsledné knihovny nebo amplifikaci clusterů.

Výrobce:

ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.

Rokycanova 4437/5, Brno-Židenice 615 00

info@elisabeth.cz | www.elisabeth.cz | tel.: +420 542 213 851



Katalogové číslo



Číslo šarže



Datum expirace



Skladovací podmínky (teplotní limity)



Výrobce



Počet reakcí v balení