

Control Primers

PP 200bp

40 reakcí

CEB-P-0444-40

www.cebiosys.cz



Obsah soupravy a skladování

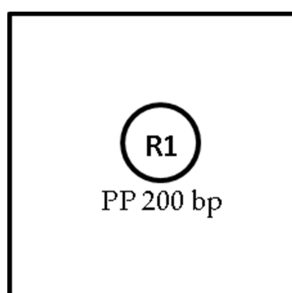
Control Primers - PP 200 bp obsahuje jeden primer pár na provedení 40 PCR reakcí. Souprava je primárně určena jako doplněk k DNA integrity testing Kit (CEB-P-0442-50, CEB-P-0442-100), ale je možné tento primer pár využít, po optimalizaci, ve jakékoliv jiné PCR reakci.

Souprava je distribuována při RT. Primer pár skladujte při -20°C v mrazáku bez funkce autoodmrazování. Reagencii před použitím pečlivě promíchejte. Při řádném skladování je garantována funkčnost všech složek soupravy minimálně 6 měsíců od data dodání.

Obsah částí dodávané na suchém ledu

Množství	Reagencie	Skladování
44 μl	Reagent 1: PP 200 bp ($8 \mu\text{M}$)	-20°C

Schéma uspořádání reaglií v balení dodávaném na suchém ledu



Reagencie, které nejsou součástí soupravy

Nuclease-free voda (např. Amresco, cat. E476)

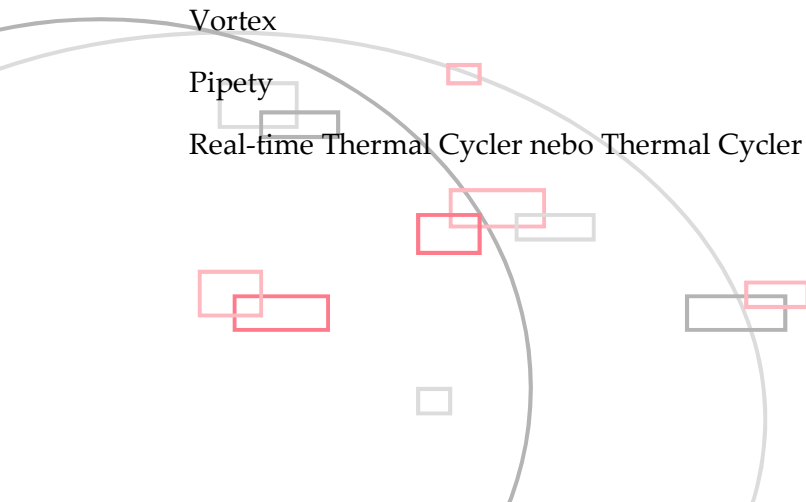
Potřebné přístroje a pomocná zařízení

Chlazená centrifuga

Vortex

Pipety

Real-time Thermal Cycler nebo Thermal Cycler



Princip a použití

Pro posouzení integrity DNA, např. pro odhad úspěšnosti PCR amplifikace či použití v mikroarrayových experimentech, doporučujeme provést kontrolní PCR pomocí pěti primer párů (PP 100bp, PP 200bp, PP 300bp, PP 400bp, PP 600bp). Následným vyhodnocením jak pomocí qPCR a/nebo gelové elektroforézy analyzujeme odpovídající produkty PCR. Přítomnost pěti různých kontrolních PCR produktů, v rozmezí 100 až 600 bp, lze vyhodnotit jako vhodný ukazatel pro stupeň fragmentace DNA a tedy i pro použití v dalších aplikacích.

Příklad: Kvalita aCGH kriticky závisí na integritě DNA vzorků a právě pomocí kontrolní PCR je možné odhadnout, zda např. archivní FFPE tkáňový vzorek je vhodný pro aCGH. DNA, ze které lze získat produkt PCR, dosahující délky minimálně 300bp je vhodný pro analýzu.

Pracovní postup stanovení integrity DNA

1. Příprava reakce qPCR s použitím primer páru PP 200bp k určení kontrolního úseku s detekcí pomocí qPCR s použitím DNA integrity testing Kit (CEB-P-0442-50, CEB-P-0442-100):

CEB SYBR Premix	10µl
primer pár (PP 200bp)	1µl
DNA	50ng
ddH ₂ O	doplnit do 20µl
<hr/>	
Total	20µl*

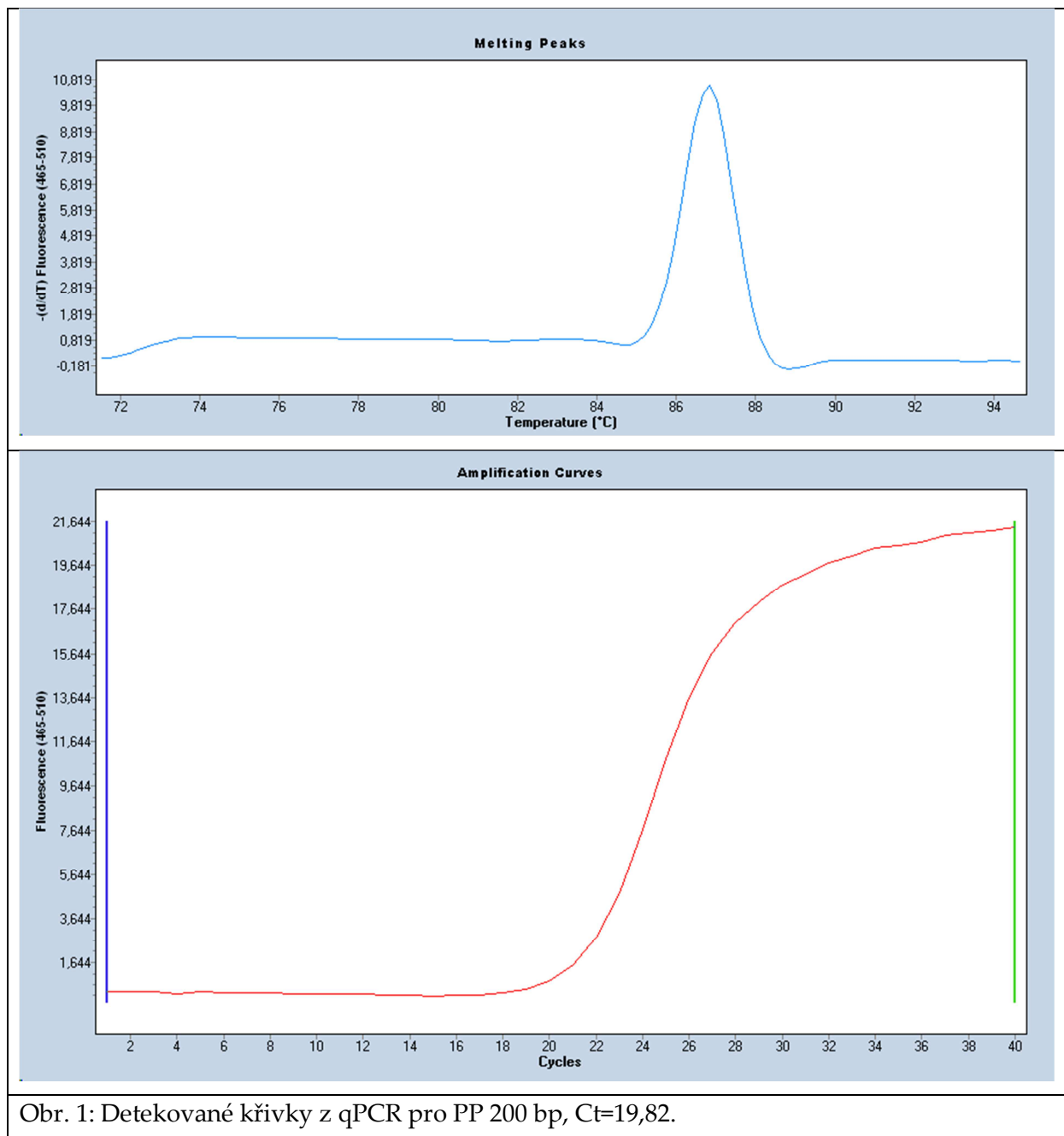
Amplifikační program*:

1. 95 °C/1'
2. 95 °C/15''
3. 60 °C/20''
4. 72 °C/30''
5. 72 °C/5'

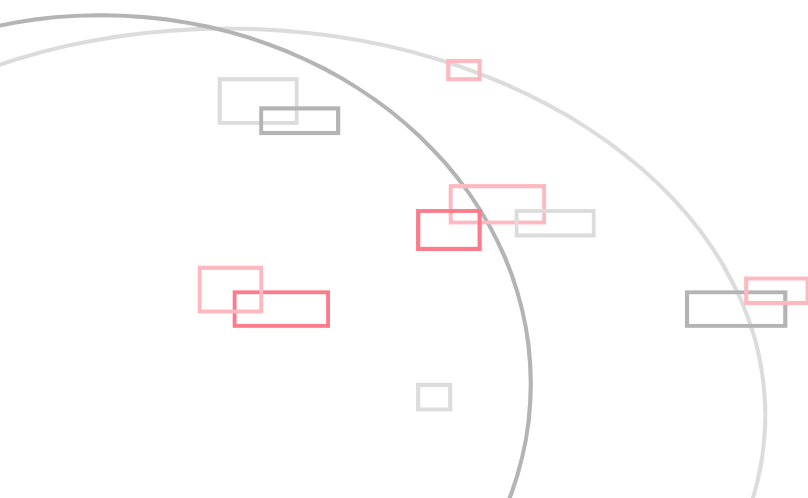
Krok 2 až 4 opakovat 40x

**Pozn. Postup je optimalizován pro real-time cycler LC 480 (Roche). Použití jiných real-time cyklerů může vyžadovat úpravu parametrů.*

Na obrázku je znázorněna amplifikační křivka (s odečtenou typickou hodnotou Ct) společně s křivkou tání qPCR 200 bp produktu.



Obr. 1: Detekované křivky z qPCR pro PP 200 bp, Ct=19,82.



Troubleshooting Guide

Problém	Možná příčina	Řešení
Nevznikl žádný nebo jen malé množství PCR produktu a příčinou nemůže být nízká integrita vzorku	Příliš nízké vstupní množství DNA do PCR reakce	Před přidáním DNA změřte koncentraci DNA a do 1 rxn použijte 50 ng.
		Pokud nemůžete analyzovat doporučené množství DNA (50 ng) zvyšte počet cyklů.

