

# DNA integrity testing Kit

**CEB-P-0442-50**

[www.cebiosys.cz](http://www.cebiosys.cz)



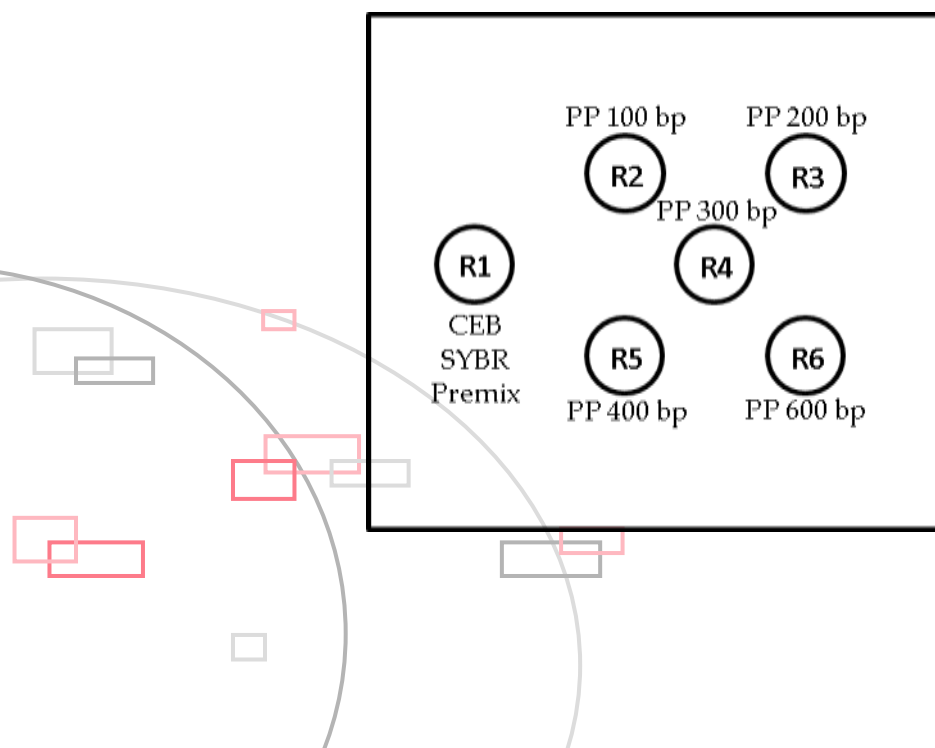
## Obsah soupravy a skladování

Kit na stanovení integrity DNA obsahuje reagentie na provedení 50 reakcí. Souprava je distribuována na suchém ledu. Primery skladujte při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  v mrazáku bez funkce autoodmrazování. CEB SYBR Premix po prvním použití již nezamrazujte a skladujte při  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Všechny reagentie 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	Reagentie	Skladování
550 $\mu\text{l}$	Reagent 1: CEB SYBR Premix (2x)	$+4\text{ }^{\circ}\text{C}$
11 $\mu\text{l}$	Reagent 2: PP 100 bp (8 $\mu\text{M}$ )	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
11 $\mu\text{l}$	Reagent 3: PP 200 bp (8 $\mu\text{M}$ )	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
11 $\mu\text{l}$	Reagent 4: PP 300 bp (8 $\mu\text{M}$ )	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
11 $\mu\text{l}$	Reagent 5: PP 400 bp (8 $\mu\text{M}$ )	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
11 $\mu\text{l}$	Reagent 6: PP 600 bp (16 $\mu\text{M}$ )	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

### Schéma uspořádání reagentií v balení dodávaném na suchém ledu



## Reagencie, které nejsou součástí soupravy

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

Agaróza

10x TBE pufr

Např. EZ-Vision Three™ DNA Dye (Amresco; N313) nebo Ethidium bromid

DNA Ladder (v min. rozmezí 100 – 600 bp) např. 50bp DNA Ladder (CEB-P-0105-250)

*Pozn. Veškeré vybavení pro provedení vlastní elektroforézy je možné pořídit jako balíček viz. DNA Electrophoresis Kit včetně aparatury (CEBCZP0108-100A) nebo DNA Electrophoresis Kit bez aparatury (CEBCZP0108-100)*

## Potřebné přístroje a pomocná zařízení

Chlazená centrifuga

Vortex

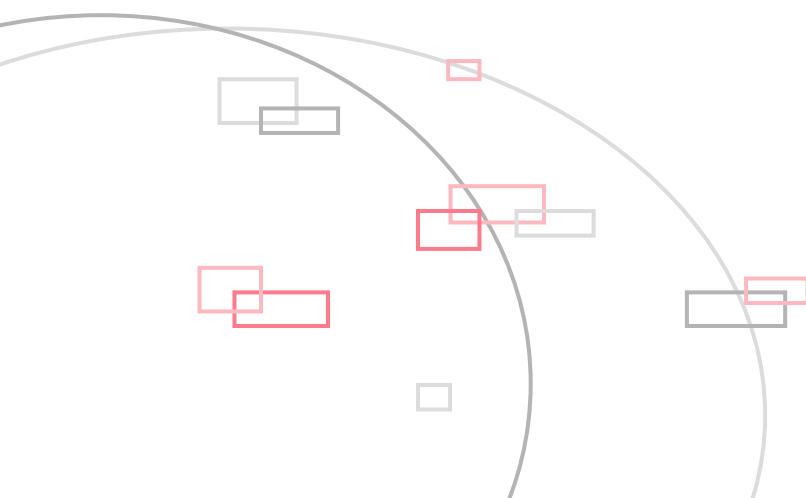
Pipety

Real-time Thermal Cyclers nebo Thermal Cyclers

Transluminátor se snímacím zařízením

Napěťový zdroj

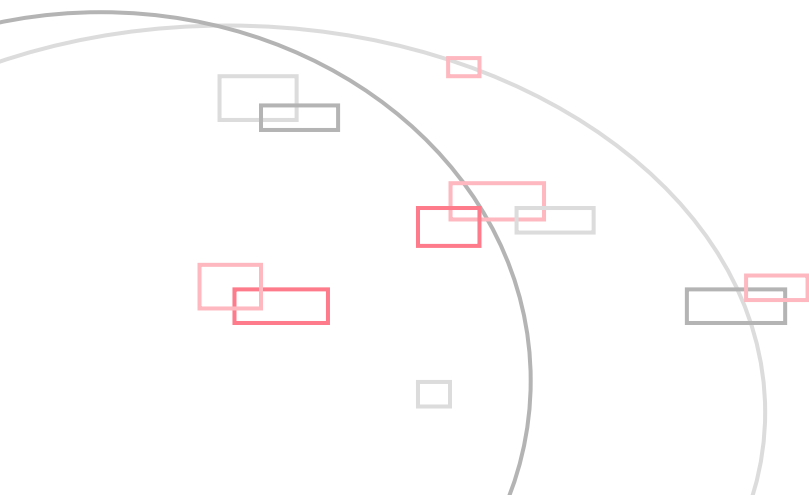
Aparatura pro horizontální elektroforézu



## Princip a použití

Pro posouzení integrity DNA, např. pro odhad úspěšnosti PCR amplifikace či použití v mikroarrayových experimentech, doporučujeme provést kontrolní PCR pomocí pěti přiložených 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

Z následujících dvou postupů si lze vybrat buď (1.) provedení pomocí qPCR s následným vyhodnocením detekovaných křivek nebo (2.) pomocí multiplexové PCR reakce a následným vyhodnocením na gelové elektroforézy. Souprava obsahuje CEB SYBR Premix na provedení 50 jednoduchých PCR reakcí (10x každý z primer párů). V případě, že budete používat multiplexové PCR reakce, doporučujeme dokoupení jednotlivých primer párů na 40 multiplex reakcí:

Control primers - PP 100bp, CEB-P-0443-40

Control primers - PP 200bp, CEB-P-0444-40

Control primers - PP 300bp, CEB-P-0445-40

Control primers - PP 400bp, CEB-P-0446-40

Control primers - PP 600bp, CEB-P-0447-40

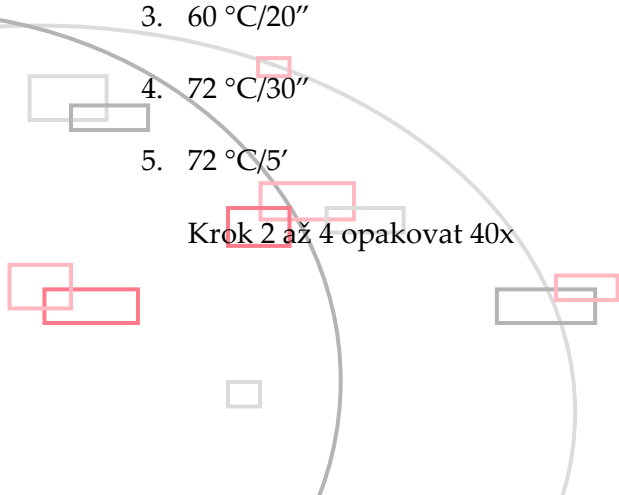
## 1. Příprava jednotlivých reakcí qPCR s použitím primer páru (PP) k určení jednoho kontrolního úseku s detekcí pomocí qPCR

CEB SYBR Premix	10 $\mu$ l
primer pár (PP xbp )	1 $\mu$ l
DNA	50ng
ddH <sub>2</sub> O	doplnit do 20 $\mu$ l
<hr/>	
Total	20 $\mu$ l*

Amplifikační program\*:

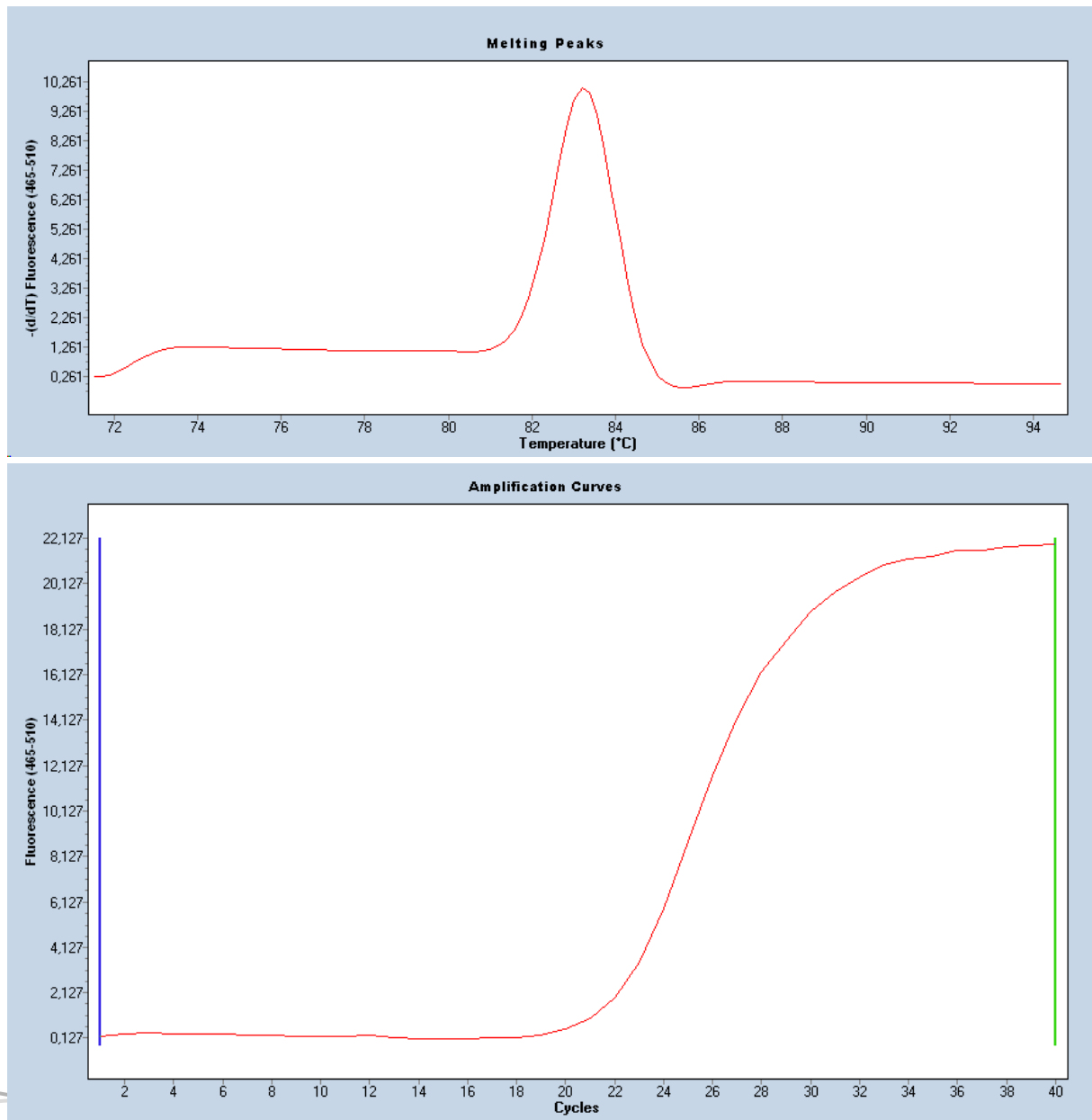
1. 95 °C/1'
2. 95 °C/15''
3. 60 °C/20''
4. 72 °C/30''
5. 72 °C/5'

Krok 2 až 4 opakovat 40x



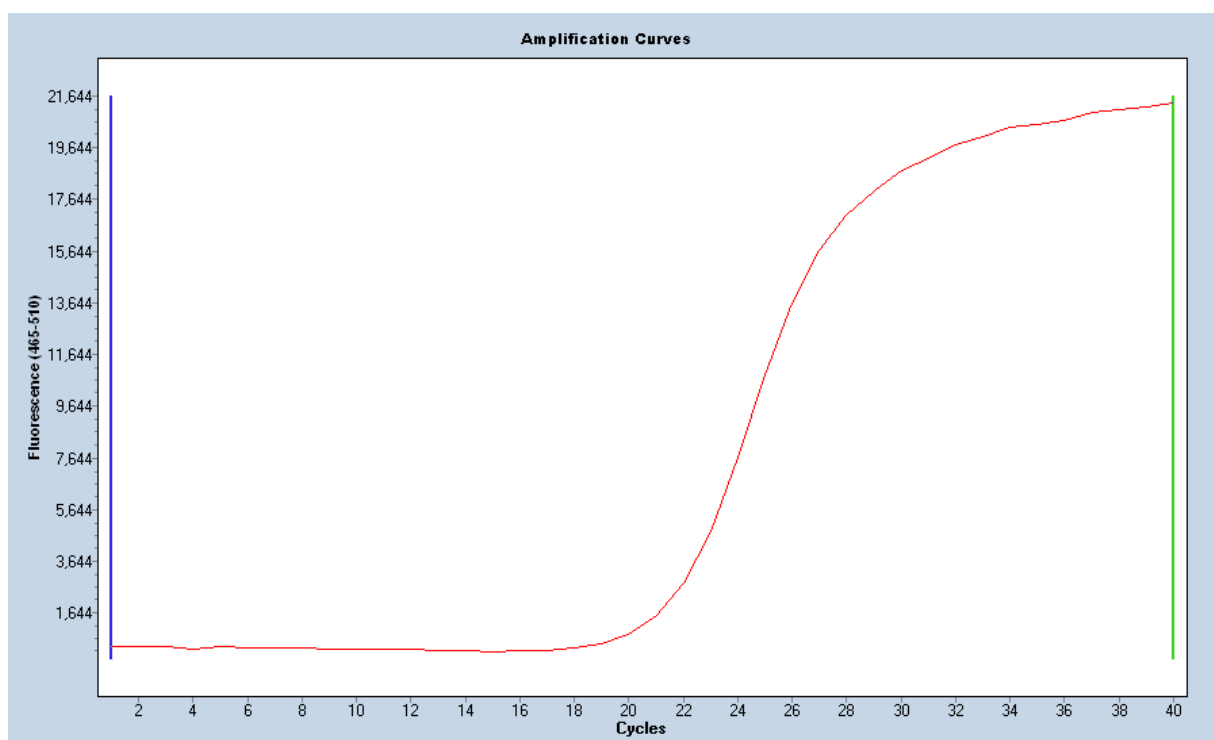
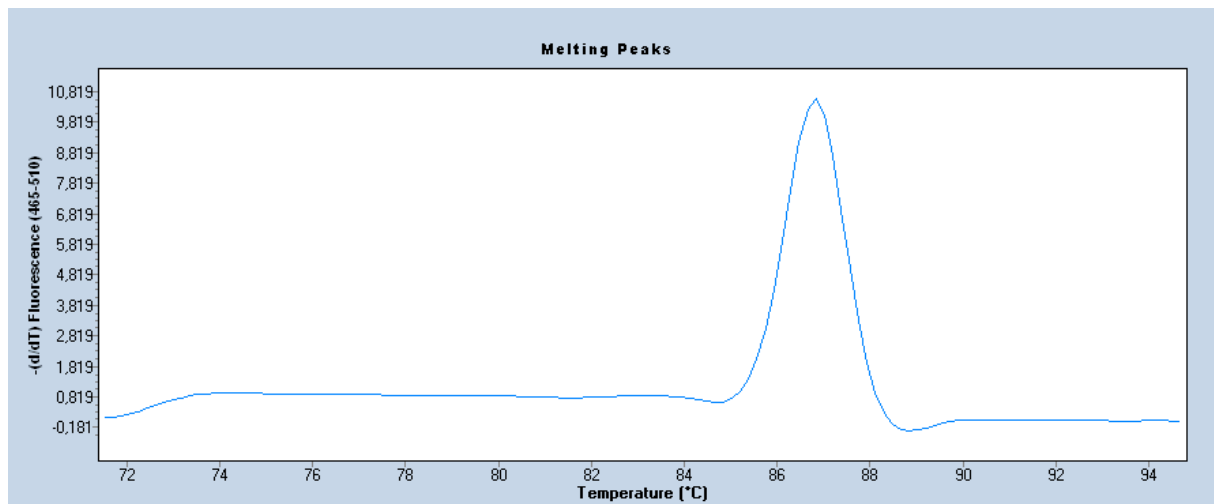
*\*Pozn. Postup je optimalizován pro real-time cycler LC 480 (Roche). Použití jiných real-time cyklerů může vyžadovat úpravu parametrů.*

Detekované křivky jednotlivých produktů z qPCR jsou znázorněny na obrázcích 1-5 společně s jejich typickými Ct hodnotami.

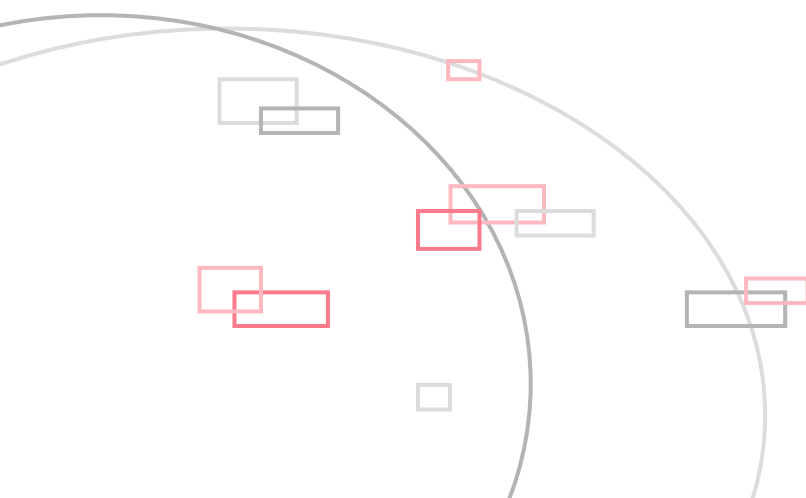


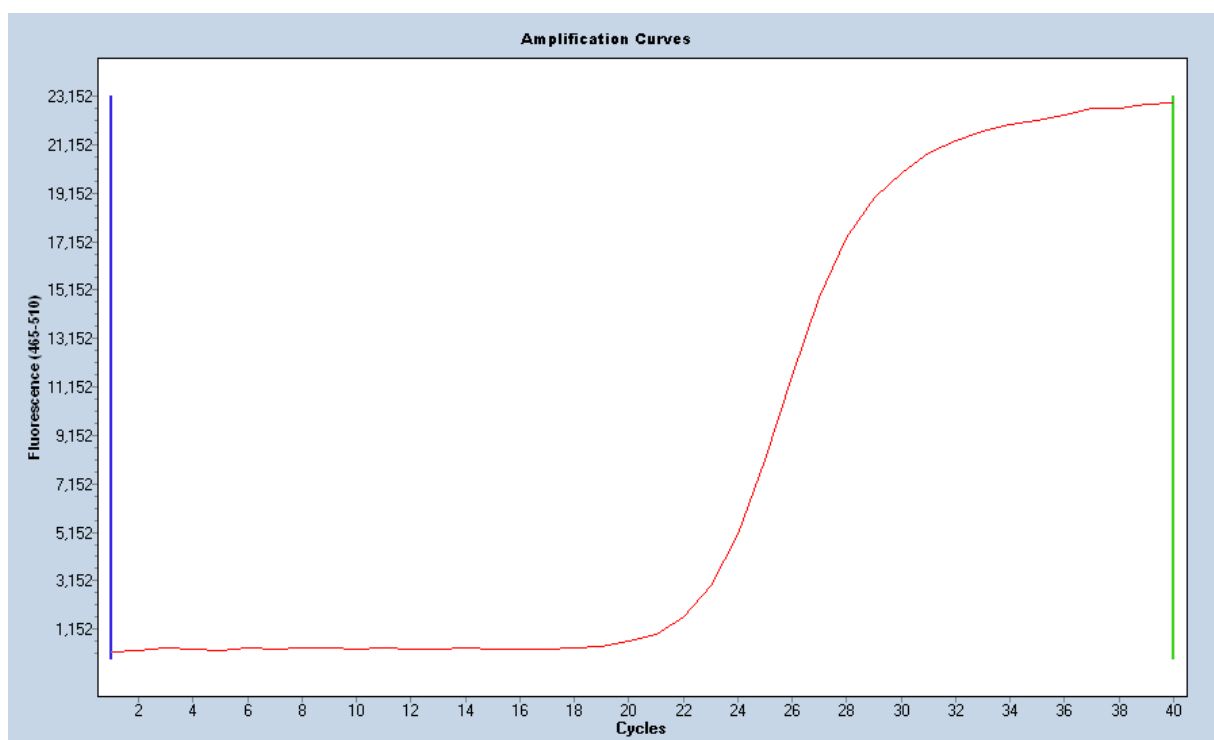
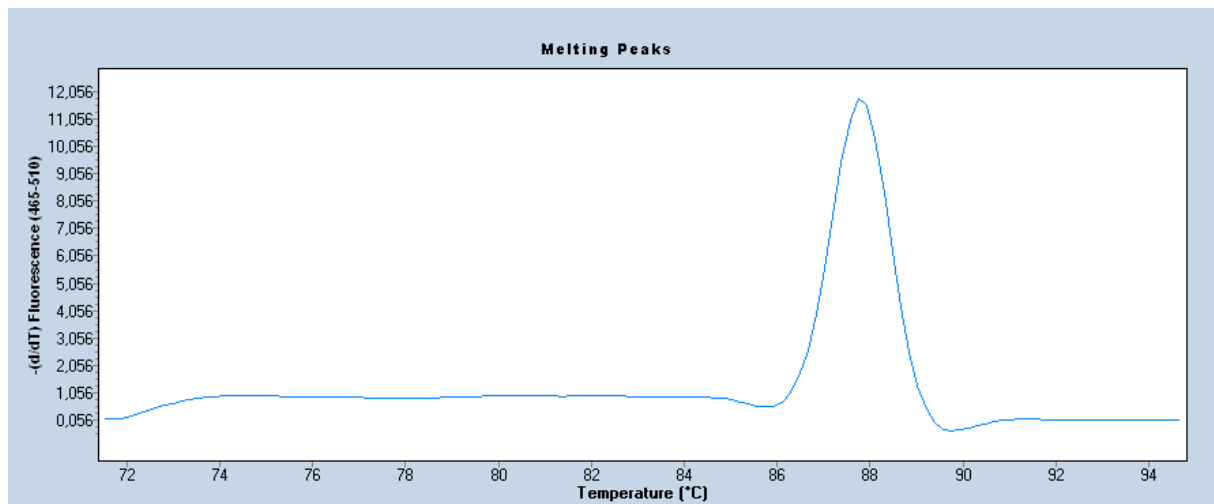
Obr. 1: Detekované křivky z qPCR pro PP 100 bp, Ct=20,45.



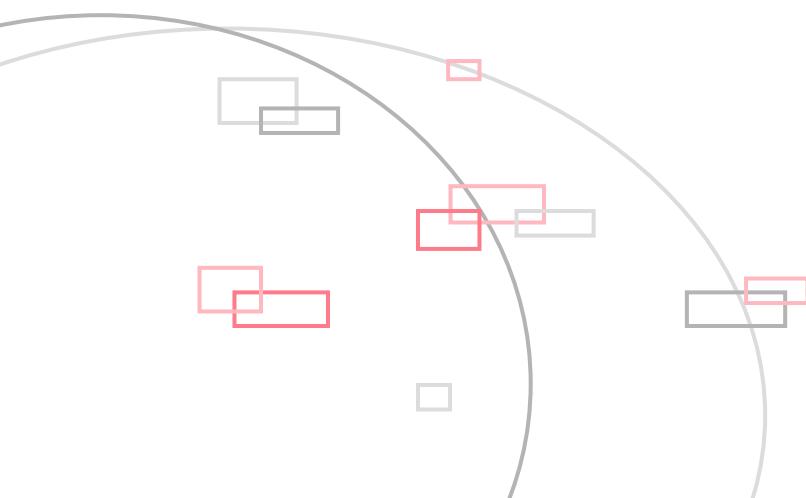


Obr. 2: Detekované křivky z qPCR pro PP 200 bp, Ct=19,82.

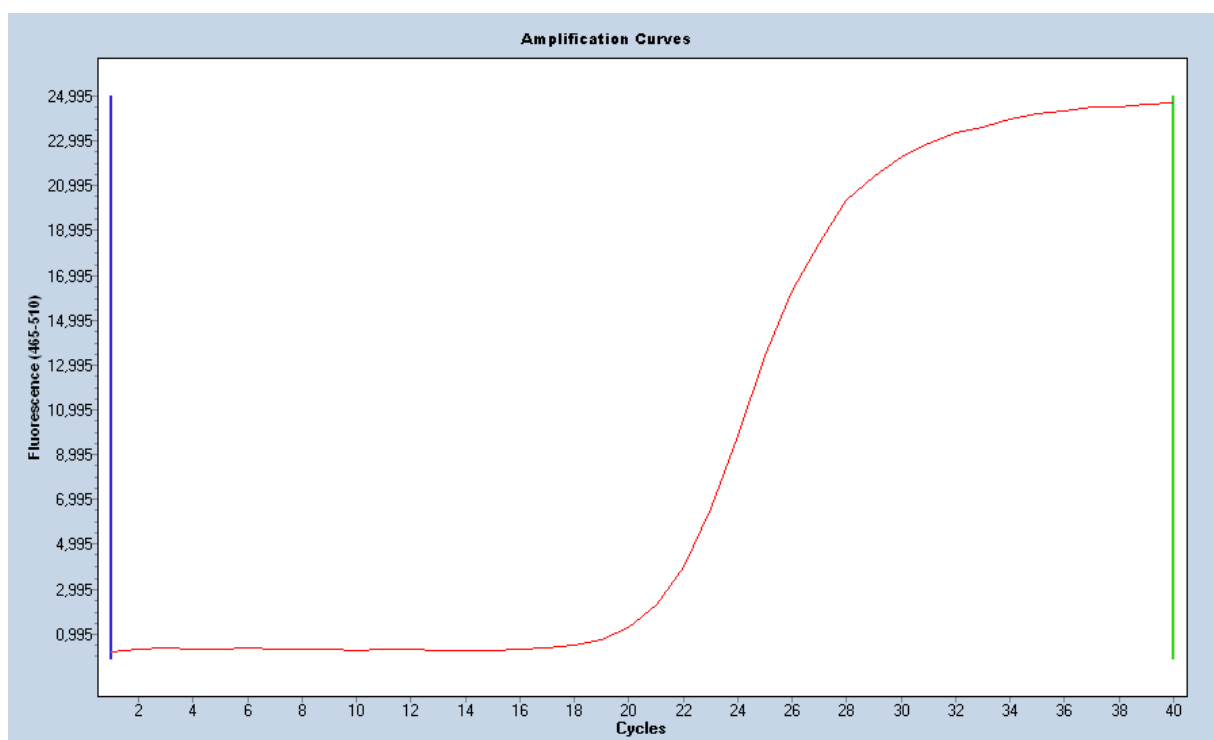
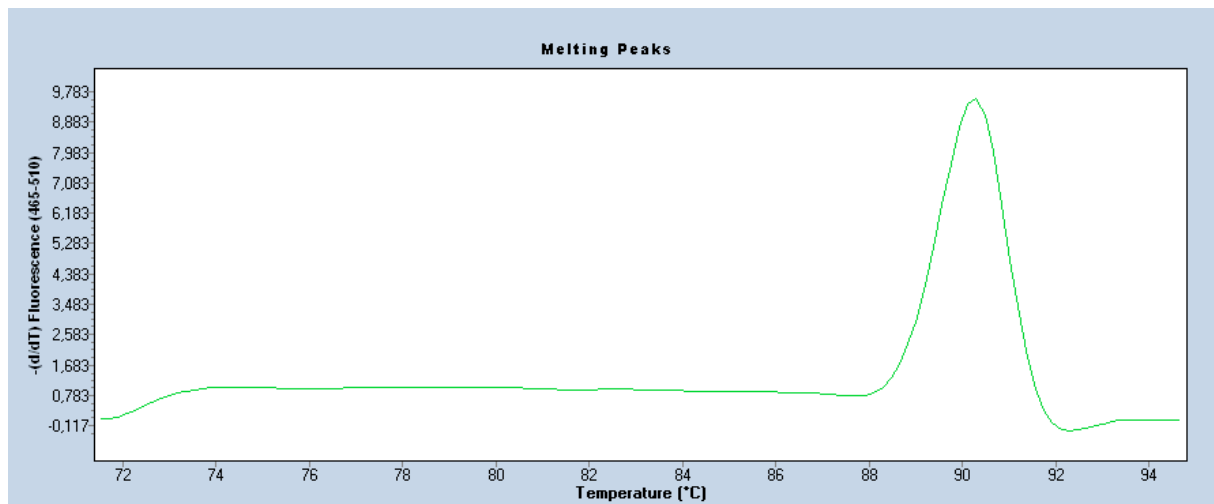




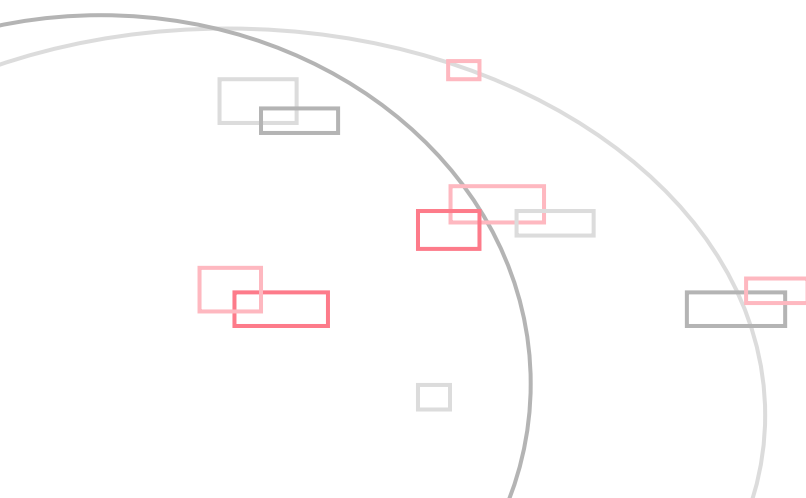
Obr. 3: Detekované křivky z qPCR pro PP 300 bp, Ct=20,42.

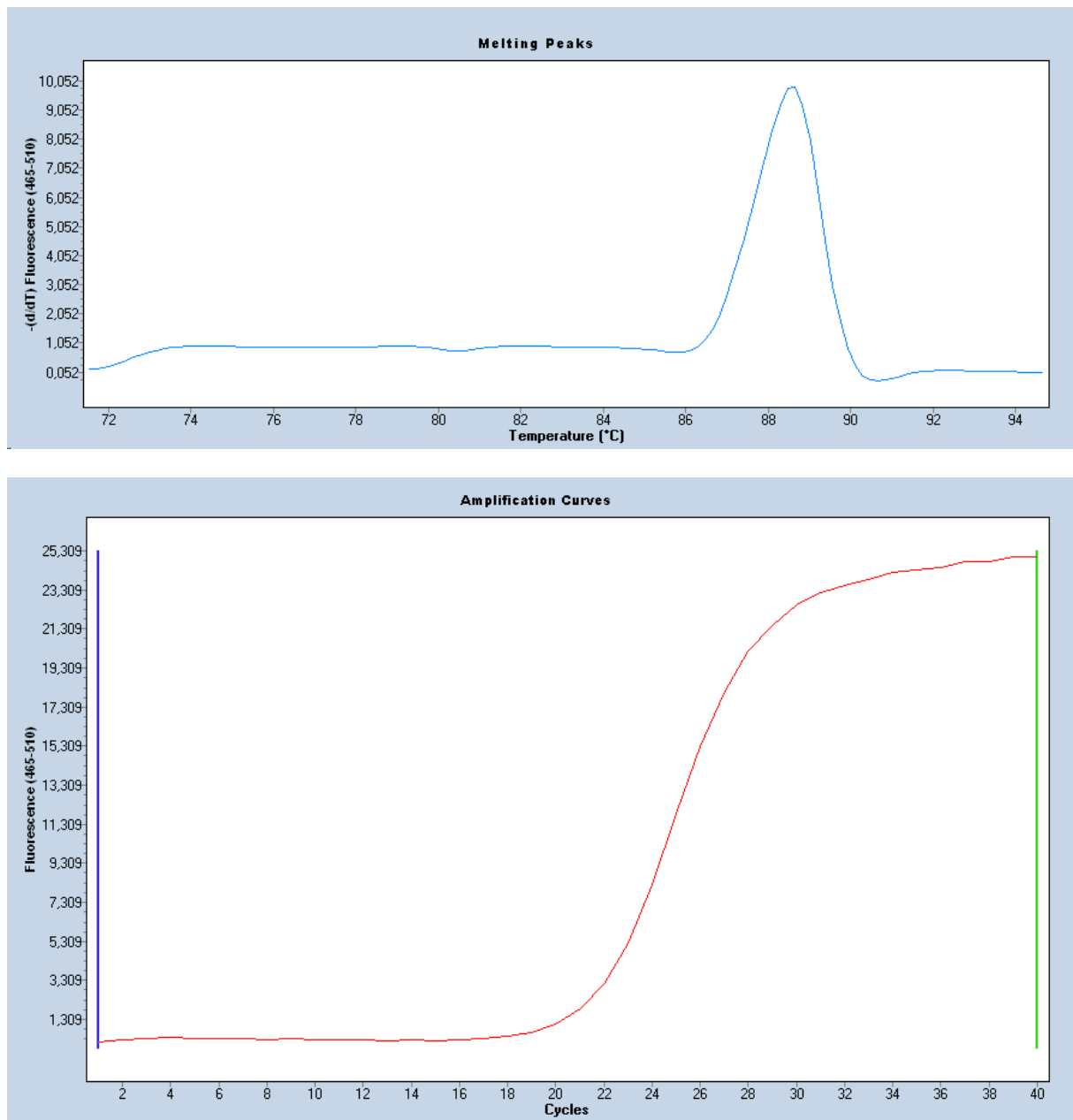




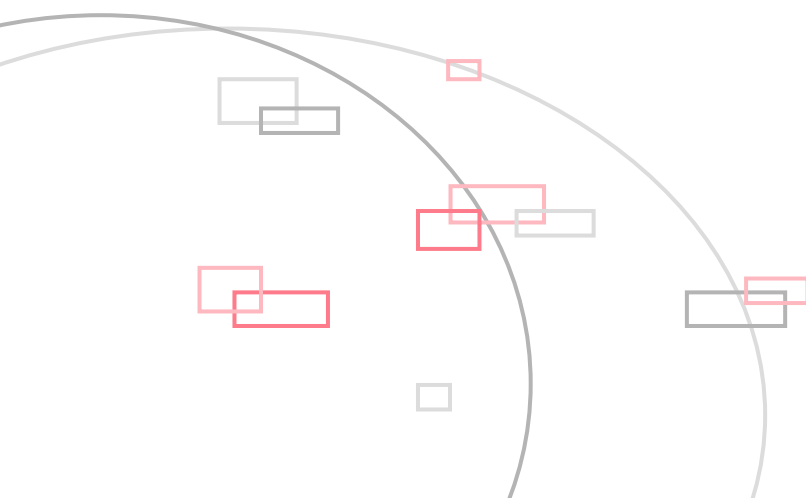


Obr. 4: Detekované křivky z qPCR pro PP 400 bp, Ct=19,06.





Obr. 5: Detekované křivky z qPCR pro PP 600 bp, Ct=19,4.



## 2. Příprava reakce multiplex PCR s použitím primer mixu k simultánní detekci všech pěti kontrolních úseků pomocí gelové elektroforézy

2.1. Nejprve si připravíme primer mix a to tak, že si od každého primer páru (PP) napipetujeme 1  $\mu$ l do mikrozkušavky.

PP 100 bp	1 $\mu$ l
PP 200 bp	1 $\mu$ l
PP 300 bp	1 $\mu$ l
PP 400 bp	1 $\mu$ l
PP 600 bp	1 $\mu$ l
<hr/>	
Total	5 $\mu$ l

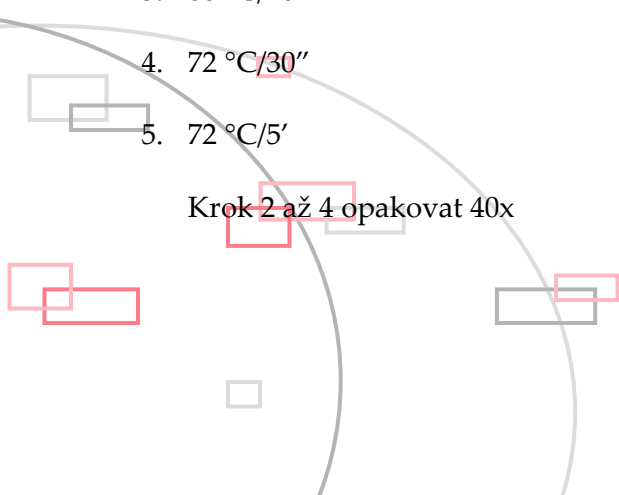
2.2. Připravte si vlastní reakční směs pro qPCR a nechte amplifikovat na cykleru podle uvedeného programu.

CEB SYBR Premix	10 $\mu$ l
primer mix	5 $\mu$ l
DNA	50ng
ddH <sub>2</sub> O	doplnit do 20 $\mu$ l
<hr/>	
Total	20 $\mu$ l

Amplifikační program\*:

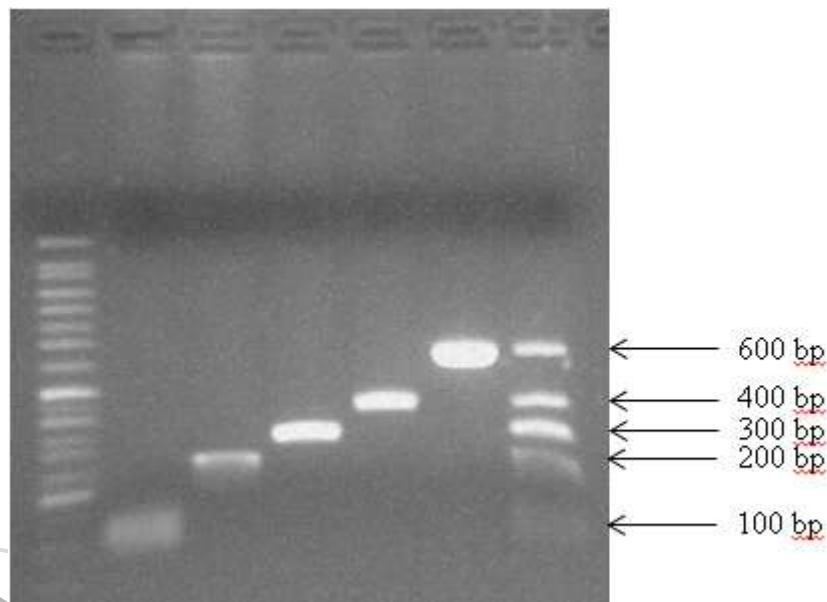
1. 95 °C/1'
2. 95 °C/15''
3. 60 °C/20''
4. 72 °C/30''
5. 72 °C/5'

Krok 2 až 4 opakovat 40x



*\*Pozn. Postup je optimalizován pro cykléry GenePro (Bioer) a LC 480 (Roche). Použití jiných cyklerů může vyžadovat úpravu parametrů.*

- 2.3. Připravte si 1,5% gel rozpuštěním práškové agarózy v 0,5x TBE pufru (pozn. na přípravu 1,5% gelu o velikosti cca 10x11 cm je potřeba 1,5 g agarózy v 100 ml 0,5x TBE). Příslušné množství agarózy v pufru se nechá několikrát projít varem v mikrovlnné troubě až do úplné homogenizaci obsahu. Horký agarózový gel nechte za občasného promíchání cca 5 minut při teplotě místnosti, poté nalijte do formy na gel a vložte hřebínek (v případě použití Ethidia bromidu nechte agarózový gel vychladnout až na cca 50 °C a teprve poté přidejte Ethidium bromid v konečné koncentraci na gel 0,5 µg/ml). Výška gelu je dána velikostí hřebínku. Gel nechte zatuhnout minimálně 30 min. při pokojové teplotě.
- 2.4. Naneste produkty PCR společně s ladderem (50-1500 bp) na gel a to tak, že smícháte v poměru 5:1 PCR produkt/ladder:fluorescentní barvička nebo v odpovídajícím poměru k Vámi používaném vzorkovém pufru (v případě použití Ethidium bromidu).
- 2.5. Elektroforetickou aparaturu připojte ke zdroji elektrického napětí (60 - 120V).
- 2.6. Po dosažení vhodného rozdělení fragmentů, zdroj napětí vypněte a gel opatrně přeneste na transluminátor.
- 2.7. Odečtěte správnou velikost fragmentů DNA.



## 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.

