

QuantumDNA

на сайт

НАБОРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ КОНЦЕНТРАЦИИ И КАЧЕСТВА
ГЕНОМНОЙ ДНК ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПЦР-PV

Наборы **QuantumDNA** позволяют определить концентрацию ДНК человека, пригодной для амплификации, и установить наличие ингибиторов ПЦР в образце.

QuantumDNA-Set дополнительно позволяет оценить степень фрагментации ДНК в образце и рассчитать концентрацию фрагментов ДНК для любой длины в диапазоне 50-500 п.о.

QuantumDNA-Set включает в себя компоненты трех наборов (QuantumDNA-91, -156, -211).

Рекомендации к использованию

Наборы применяются для оценки качества ДНК человека:

- выделенной из биоматериала, в котором могла произойти частичная деградация ДНК:
 - срезы с парафиновых блоков FFPE, в т.ч. на стеклопрепаратах;
 - образцы тканей, длительно хранившиеся без фиксации;
 - фиксированные формалином и прошедшие гистологическую обработку ткани;
- перед постановкой любой аналитической ПЦР;
- перед STR-генотипированием.

Принцип метода

Определение эффективной концентрации ДНК и наличия ингибиторов происходит одновременно по двум каналам флуоресценции.

Измерение концентрации ДНК происходит относительно Стандартов 0.5, 3.5 и 25 нг/мкл (см. рис. 1). Программное обеспечение амплификатора строит калибровочный график (см. рис. 2), по которому рассчитывает концентрацию ДНК в исследуемых образцах.

Расчет концентрации ДНК для амплификации фрагментов от 50 до 500 п.о.

С помощью **QuantumDNA-Set** и онлайн-калькулятора «КАЛЬQЛЯТОР» (см. рис. 3) можно оценить концентрацию ДНК для ампликонов длиной от 50 до 500 п.о.

<http://evrogen.ru/products/QuantumDNA/fragmentation.shtml#DNAcalc>

Набор	Длина ампликона*	Кат. №	Кол-во реакций
QuantumDNA-91	91	QS001	
QuantumDNA-156	156	QS002	200
QuantumDNA-211	211	QS003	
QuantumDNA-Set	91, 156, 211	QS004	3 x 200

* При выборе набора QuantumDNA необходимо знать длину ампликона целевой ПЦР. Она должна примерно совпадать или быть меньше длины ампликона набора QuantumDNA. Если длина целевой ПЦР > 220 п.о., используйте набор QuantumDNA-Set.

Подробную информацию о наших продуктах и сервисах можно получить на сайте www.evrogen.ru

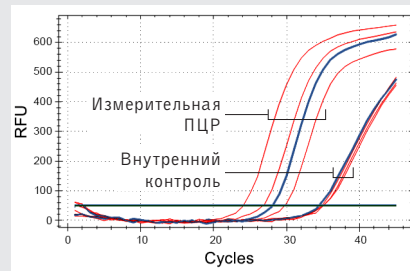
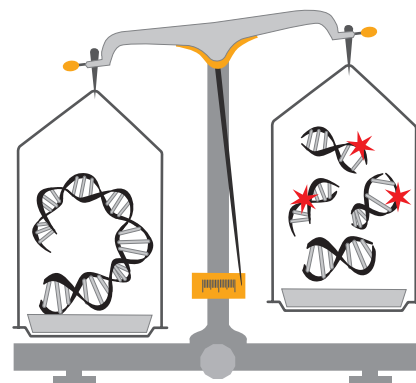


Рис. 1. Кривые накопления ПЦР-продукта для стандартов Quantum и образца с неизвестной концентрацией. Красный – стандарты с известной концентрацией. Синий – тестируемый образец.

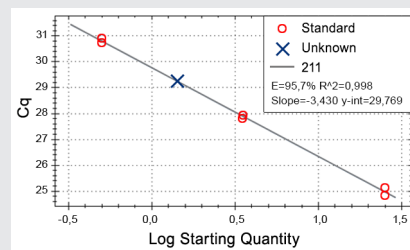


Рис. 2. Калибровочный график на основе стандартов (кружки). Крестик – проекция Cq исследуемого образца на калибровочную кривую, по которой рассчитывается его концентрация.

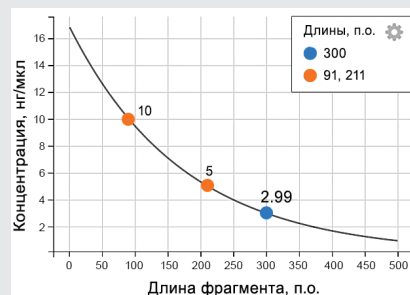


Рис. 3. Расчет концентрации ДНК с помощью «КАЛЬQЛЯТОРА» для длины 300 п.о. по данным для 91 и 211 п.о.

Сравнение со спектрофото- и флуориметрическими методами

Перед постановкой аналитических реакций с геномной ДНК человека важно оценить концентрацию ДНК в препарате. Такую оценку часто делают с помощью спектрофотометрических или флуориметрических методов. Однако, эти методы не учитывают критичных для ПЦР параметров.

Параметр	Спектрофотометр/флуориметр	Наборы QuantumDNA
Измеряемая концентрация ДНК*	абсолютная	эффективная
Проверка наличия ингибиторов ПЦР	нет	да
Расчет концентрации ДНК длиной от 50 до 500 п.о.	нет	да (QuantumDNA-Set)

* Абсолютная – вся ДНК, в т.ч. деградированная и модифицированная;
Эффективная – только ДНК, пригодная для ПЦР.

Отличие абсолютной концентрации ДНК от эффективной

Эффективная концентрация ДНК часто бывает ниже абсолютной по двум причинам:

1. В образце присутствуют ингибиторы ПЦР.

Наличие ингибиторов ПЦР нельзя оценить с помощью спектрофото- и флуориметрических методов. В присутствии ингибиторов, даже при достаточном количестве ДНК, результаты аналитической реакции будут искажены.

В реагенты QuantumDNA включен внутренний контроль для детекции ингибиторов ПЦР. В случае их обнаружения образец необходимо разбавить или переочистить для следующей реакции.

2. ДНК в образце фрагментирована и/или химически модифицирована.

Оптические методы не дают полных данных о состоянии ДНК в образце. Когда ДНК частично деградирована, концентрация суммарной ДНК выше концентрации фрагментов, пригодных для ПЦР. Поэтому, если полагаться на данные спектрофотометра/флуориметра, в аналитическую реакцию будет добавлено недостаточно ДНК (см. рис. 4А, 4Б, 4В). Объем образца для ПЦР допустимо рассчитывать только исходя из данных, полученных методом ПЦР.

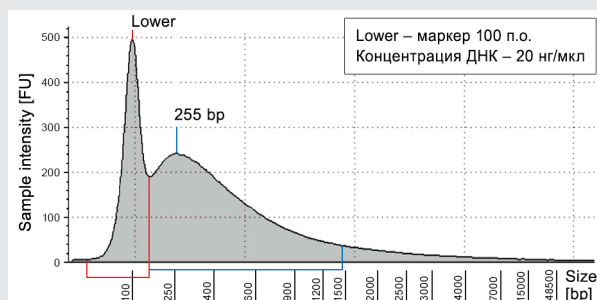


Рис. 4А. Измерение абсолютной концентрации препарата и распределения молекул ДНК методом электрофореза (TapeStation 2200, Agilent).

Вывод: средний размер фрагментов – 255 п.о., абсолютная концентрация ДНК – 20 нг/мкл.

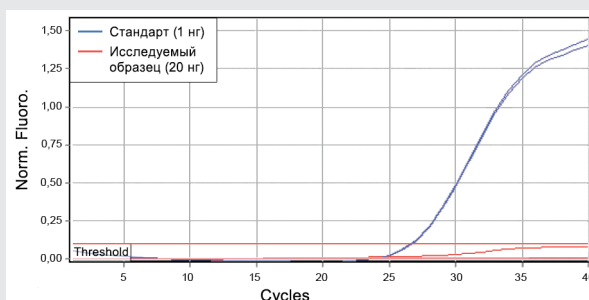


Рис. 4Б. Аналитическая ПЦР (ген *EGFR*), длина ампликона 200 п.о.

Вывод: реакция длиной 200 п.о. с образцом не развивается, несмотря на удовлетворительные данные предварительного анализа на спектрофотометре.

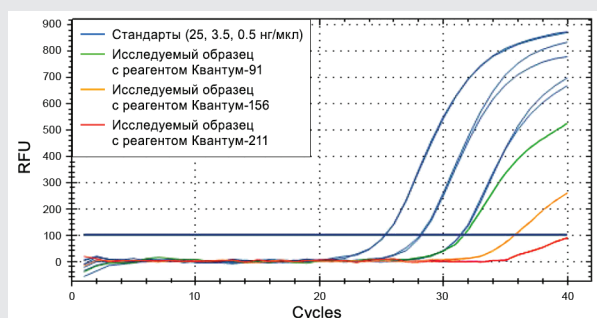


Рис. 4В. Измерительная ПЦР с набором QuantumDNA-Set.

Фрагменты длиной от 91 п.о.: 0.5 нг/мкл;
фрагменты от 156 п.о.: 0.07 нг/мкл;
фрагменты от 211 п.о.: < 0.0001 нг/мкл.

Вывод: образец существенно фрагментирован, не рекомендуется для реакций с длиной ампликона более 150 п.о.

Вывод с учетом данных по электрофореграмме: ДНК в образце не только фрагментирована, но и значительно химически модифицирована. Несмотря на высокую абсолютную концентрацию ДНК, эффективность амплификации существенно снижена. Рекомендуется использовать образец для реакций с длиной ампликона до 150 п.о., либо концентрировать или переочистить.