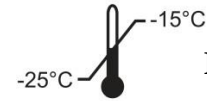




For In Vitro Diagnostic Use



Bảo quản ở -25°C đến -15°C

REF

LIBQ-NGS

# Library Quantification for Illumina®

## Dùng cho Real-Time PCR

Bộ thuốc thử đánh giá chất lượng thư viện cho giải trình tự Illumina®

Tương thích với các hệ thống:

- ABI Prism® - 7500Fast

Hướng dẫn sử dụng – Phiên bản 1.1



## Nội dung

Nội dung.....	2
1. Điều kiện bảo quản .....	3
2. Chuẩn bị cho xét nghiệm (cho tất cả các thiết bị).....	4
3. Phân tích.....	6
4. Đánh giá hiệu suất.....	7
5. Ký hiệu sử dụng .....	8
6. Thông báo đến khách hàng .....	9
1.1 Điều khoản bảo hành .....	9
1.2 Giới hạn bảo hành.....	9
7. Thông tin liên hệ .....	11

## 1. Điều kiện bảo quản

Sản phẩm được vận chuyển bằng đá đông lạnh. Thành phần phải được bảo quản ở nhiệt độ  $-25^{\circ}\text{C}$  đến  $-15^{\circ}\text{C}$  ngay khi nhận được.

- Bảo quản tất cả các thành phần chưa sử dụng trong hộp chứa ban đầu.
- Hỗn hợp phản ứng SYBR Green phải tránh sáng mọi lúc để tránh mất thuốc nhuộm huỳnh quang. Thiết kế thí nghiệm phải được thực hiện trong tủ hút tắt đèn, vì màu nhuộm có thể bắt sáng từ ánh sáng trực tiếp trong tủ khi hút vào trong các đĩa
- Ly tâm tất cả các ống trước khi mở nắp.
- Ngày hết hạn của mỗi thành phần được in trên nhãn mỗi ống. Sản phẩm hoạt động tốt trong thời gian sử dụng. Hiệu suất không được đảm bảo sau ngày hết hạn. Đối với các ống không có hạn sử dụng, dùng hạn in trên hộp.

Bảng tóm tắt ngắn về các điều kiện bảo quản và thao tác cần thiết để đảm bảo độ ổn định của bộ thuốc thử:

**Reaction Master Mix:** bảo quản ở  $-25^{\circ}\text{C}$  đến  $-15^{\circ}\text{C}$ . Rã đông 1 ống để sử dụng và bảo quản ở  $4^{\circ}\text{C}$  –  $8^{\circ}\text{C}$  tối đa 1 trong 1 tháng. Không làm đông – rã đông thuốc thử nhiều hơn 3 lần, lặp lại quá trình này sẽ ảnh hưởng đến hoạt độ enzyme. Nếu mỗi ống thuốc thử được sử dụng lâu hơn 1 tháng, chia nhỏ hoá chất để bảo quản.

**Primer/Probe Mix:** bảo quản ở  $4^{\circ}\text{C}$  –  $8^{\circ}\text{C}$ . Khi đã rã đông sẽ sử dụng được trong khoảng 60 ngày. Nếu muốn sử dụng lâu hơn 60 ngày, chia nhỏ hoá chất sau khi rã đông lần đầu và giữ phần chưa sử dụng ở  $-25^{\circ}\text{C}$  đến  $-15^{\circ}\text{C}$ . Không được làm đông – rã đông hơn 3 lần.

**Positive Control Mix:** khuyến cáo chia nhỏ thuốc thử sau lần rã đông lần đầu và bảo quản thời gian dài ở  $-25^{\circ}\text{C}$  đến  $-15^{\circ}\text{C}$ . Chỉ rã đông 1 lần và bảo quản ở  $4^{\circ}\text{C}$  –  $8^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Chuẩn bị cho xét nghiệm (cho tất cả các thiết bị)

1. Pha loãng thư viện thí nghiệm từ phần G trong buffer pha loãng (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 + 0.05% Tween 20) hoặc nước SHPT khử trùng khoảng 1000 hoặc 10000 lần. Mỗi mẫu thư viện pha loãng được chạy ba lần phản ứng. Tối đa 25 thư viện khác nhau có thể được định lượng trên một đĩa 96 giếng (xem hình 1 bên dưới đối với bố trí đĩa).

2. Mỗi đĩa qPCR sẽ chứa các hoá chất sau cho một phản ứng trên mỗi thư viện, chuẩn và chứng. Nhân thể tích thuốc thử với 3.05 để tính master mix cho mỗi thư viện với lượng dư 5% trừ hao sai sót hút nhả. Bộ thuốc thử cung cấp đủ hoá chất cho 75 phản ứng trong ba lần bao gồm tất cả các chứng.

Thuốc thử	Thể tích (được chuẩn bị với thể tích lớn hơn 5%)
SYBR Green Reaction Mix (2X)	10 * 3.05
Library Quantification Primer Mix	5 * 3.05
Thư viện pha loãng, mẫu chuẩn hoặc nước (NTC)	5 * 3.05

Hình 1: Bố trí đĩa cho định lượng thư viện (C = Chuẩn, S = thư viện pha loãng, NTC = Chứng âm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C1	C1	S3	S3	S3	S11	S11	S11	S19	S19	S19
B	C2	C2	C2	S4	S4	S4	S12	S12	S12	S20	S20	S20
C	C3	C3	C3	S5	S5	S5	S13	S13	S13	S21	S21	S21
D	C4	C4	C4	S6	S6	S6	S14	S14	S14	S22	S22	S22
E	C5	C5	C5	S7	S7	S7	S15	S15	S15	S23	S23	S23
F	C6	C6	C6	S8	S8	S8	S16	S16	S16	S24	S24	S24
G	S1	S1	S1	S9	S9	S9	S17	S17	S17	S25	S25	S25
H	S2	S2	S2	S10	S10	S10	S18	S18	S18	NTC	NTC	NTC

3. Bắt đầu chạy trên ABI 7500/7500 Fast

(1) Trên phần mềm AB7500 Fast, đi đến **New Experiment**

(2) Dưới thanh Setup, chọn Experimental Properties

- (a) Đặt tên xét nghiệm
- (b) Chọn 7500 hoặc 7500 Fast, tùy thuộc vào thiết bị
- (c) Chọn **Quantitation Comparative Ct, SYBR green** cho thuốc thử và **Standard** cho kiểu phân tích
- (3) Trong Plate Setup, chọn mục **Define Targets and Samples**
- (a) Đặt tên mục tiêu là **LibQ**
- (b) Thiết lập Reporter: **SYBR**
- (c) Thiết lập Quencher: **NONE**
- (d) Thêm tên mẫu vào ô **Define Samples**
- (4) Đi đến mục **Assign Targets and Samples**. Chỉ định mục tiêu và tên mẫu thích hợp cho các giếng tương ứng. Đặt **Passive reference dye** là **NONE**.
4. Ở **Run Method**, thiết lập các thông số chạy như sau:

Bước	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ
Biến tính ban đầu	95°C	5 phút	1
Biến tính	95°C	30 giây	35
Bắt cặp/Kéo dài	60°C	45 giây	
Giữ	4°C	∞	1

Chú ý: giữ trạng thái Melt Curve mặc định

### 3. Phân tích

*ABI 7500*

1. Đi đến mục Analysis và chọn Amplification Plot.
2. Chọn Analysis Settings. Thiết lập LibQ threshold đến 500,000 và baseline từ 1-3.
3. Xuất kết quả. Nhập kết quả dạng file xls vào các bảng tính tự động (tải từ [entrogen.com/software](http://entrogen.com/software)) để có nồng độ của mỗi mẫu. Phân tích đường cong nóng chảy cho thông tin dimer adapter (sẽ thấy có đỉnh nhiệt nếu dimers adapter có mặt).

## 4. Đánh giá hiệu suất

### A. Độ chính xác

Ba lô chuẩn được chạy lặp lại ba lần với bộ Library Quantification for Illumina® trên thiết bị ABI 7500 ở nhiều ngày khác nhau. Kết quả được tóm tắt dưới đây:

Chuẩn	Nồng độ (pM)	Trung bình Ct lô 1	Trung bình Ct lô 2	Trung bình Ct lô 3	Trung bình	Std Dev.
1	10	10.96	10.94	10.93	10.94	0.01
2	1	14.5	14.71	14.42	14.54	0.12
3	0.1	18.03	18.01	17.99	18.01	0.02
4	0.01	21.55	21.53	21.75	21.61	0.1
5	0.001	25.03	25	25.17	25.06	0.08
6	0.0001	28.15	27.98	28.12	28.08	0.07

### B. Độ tuyến tính

Độ tuyến tính được ước lượng bằng cách kiểm tra 6 tiêu chuẩn. Thử nghiệm được thực hiện qua 3 lô và ba lần. Các đường hồi quy tuyến tính cho thấy sự tuyến tính trong sáu nồng độ được thử nghiệm từ 10 đến 0.0001 pM với giá trị  $R^2$  của 1.00, 0.99 và 0.99 đối với ba lô được thử nghiệm.

## 5. Ký hiệu sử dụng

Các ký hiệu dưới đây ghi trên nhãn và bao bì của sản phẩm dựa trên chuẩn EN980.



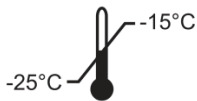
Số danh mục



Số lô



Ngày hết hạn



Điều kiện bảo quản



Nhà sản xuất



Mục đích sử dụng



Đại diện Ủy ban Châu Âu



## 6. Thông báo đến khách hàng

### 1.1 Điều khoản bảo hành

EntroGen bảo đảm sản phẩm không có sai sót về vật liệu và sự sản xuất, phải tuân thủ các yêu cầu kỹ thuật của EntroGen tại thời điểm vận chuyển. Tùy thuộc vào sự xác minh của EntroGen và khi có thông báo bằng văn bản của khách hàng, nếu sản phẩm không tuân thủ các yêu cầu kỹ thuật hoặc bất kỳ thiếu sót nào về nguyên liệu hoặc sản xuất trong vòng 30 ngày kể từ ngày vận chuyển, toàn bộ trách nhiệm pháp lý của EntroGen và cách khắc phục riêng cho từng khách hàng có thể là sửa chữa hoặc thay thế các sản phẩm bị lỗi.

### 1.2 Giới hạn bảo hành

Điều kiện bảo hành không bao gồm bất kỳ thiệt hại của sản phẩm do sử dụng sai mục đích, lựa chọn địa điểm không phù hợp, các thao tác của khách hàng hoặc bất kỳ hoạt động nào trái với hướng dẫn và các thông số thiết lập cho sản phẩm. Điều kiện bảo hành không bao gồm các thiệt hại hoặc thiết sót do sửa chữa hoặc thay đổi vị trí của sản phẩm do các đơn vị khác ngoài đại diện của EntroGen. Hơn nữa, sản phẩm được thiết kế để thực hiện các phản ứng ở độ nhạy phân tích được chỉ định cho mẫu DNA không bị phân mảnh nhiều và không chứa các vật liệu có thể ức chế phản ứng khuếch đại. Bảo hành không bao gồm mọi thiệt hại do tai nạn, phá hoại, hỏa hoạn, lũ lụt, các yếu tố môi trường khác hoặc các điều kiện bất khả kháng. Các mặt hàng được bảo hành không bao gồm mặt hàng được cung cấp bởi các nhà sản xuất thứ ba, chẳng hạn như máy tính và phần mềm có liên quan. Nếu bạn có thắc mắc về điều kiện bảo hành, hãy liên hệ với dịch vụ khách hàng của EntroGen.

**BẢO HÀNH ĐƯỢC THỰC HIỆN THAY CHO TẤT CẢ CÁC ĐIỀU KIỆN KHÁC, NHƯ BẢO HÀNH RÕ RÀNG HAY NGỤ Ý, BAO GỒM NHƯNG KHÔNG GIỚI HẠN ĐỐI VỚI BẢO HÀNH NGỤ Ý VỀ TÍNH THƯƠNG MẠI HOẶC TÍNH PHÙ HỢP CHO MỘT MỤC ĐÍCH CỤ THỂ; BẤT KỲ BẢO HÀNH NGỤ Ý NÀO PHÁT SINH TỪ MỘT QUÁ TRÌNH GIAO DỊCH HOẶC THỰC HIỆN, TÙY CHỈNH HOẶC SỬ DỤNG THƯƠNG MẠI; HOẶC BẤT KỲ BẢO ĐẢM NGỤ Ý VỀ VI PHẠM BẰNG SÁNG CHẾ. TRONG BẤT KỲ TRƯỜNG HỢP NÀO, ENTROGEN SẼ KHÔNG CHỊU TRÁCH NHIỆM VỀ BẤT KỲ THIẾT HẠI NÀO, BAO GỒM NHƯNG KHÔNG GIỚI HẠN, THIẾT HẠI TRỰC TIẾP, GIÁN TIẾP, NGẪU NHIÊN, ĐẶC BIỆT HOẶC HẬU QUẢ (BAO GỒM, NHƯNG KHÔNG GIỚI HẠN, TỒN THẤT LỢI NHUẬN, DOANH THU HOẶC THU NHẬP) CHO SẢN PHẨM.**

### 1.3 Sở hữu trí tuệ

Sản phẩm dựa trên tài sản trí tuệ có giá trị và sản xuất phát triển bởi EntroGen, Inc. và được cung cấp cho tổ chức mua (khách hàng) chỉ nhằm mục đích thử nghiệm chẩn đoán phân tử để xác định các đột biến mục tiêu bằng cách sử dụng công nghệ và phương pháp của EntroGen được liệt kê và

mô tả trong hướng dẫn sử dụng kèm theo. Bất kỳ việc sử dụng sản phẩm hoặc thành phần nào của sản phẩm theo cách thức khác với mô tả trong hướng dẫn sử dụng đều bị EntroGen nghiêm cấm. Bằng cách mở hộp sản phẩm khách hàng đồng ý không thay đổi các thành phần của EntroGen cung cấp, bao gồm môi và probes và không để các thành phần sản phẩm hoặc đưa sản phẩm vào bất kỳ phân tích nào cho mục đích tạo ra một công nghệ tương tự bất kể mục đích sử dụng của nó. Khách hàng đồng ý không bán lại sản phẩm hoặc bất kỳ thành phần nào của sản phẩm cho bên thứ ba trừ khi được EntroGen cho phép bằng văn bản. Khách hàng sẽ giữ các thông tin trong hướng dẫn sử dụng sản phẩm bí mật và coi nó như một bí mật thương mại của EntroGen. Nếu khách hàng không đồng ý với các điều khoản sử dụng được mô tả ở trên, sản phẩm không sử dụng phải được trả lại đầy đủ cho EntroGen.

Không có bằng sáng chế cho thực hiện Quy trình Nuclease 5' được chuyển tải, bằng ngụ ý hoặc bằng cách đưa ra quyết định mua cho người mua. Giấy phép và giấy phép bổ sung có thể được yêu cầu để thực hiện một số phần của xét nghiệm này. Người mua/người dùng cuối có trách nhiệm tìm kiếm các giấy phép đó từ người giữ bản quyền.

## 7. Thông tin liên hệ

**EntroGen, Inc**

20950 Warner Center Lane, Suite B Woodland Hills,  
CA 91367, USA Tel: +1 818 716 1070

Fax: +1 818 716 1077

Email: [info@entrogen.com](mailto:info@entrogen.com); [support@entrogen.com](mailto:support@entrogen.com)

Web: [www.entrogen.com](http://www.entrogen.com)

**Antisel SA**

Spectra Building, 12klm thessaloniki-  
Halkidiki

PO 57001, Themi, Greece Tel: +30 210 779 5980

Fax: +30 210 771 6932

Email: [antisel@antisel.gr](mailto:antisel@antisel.gr)

Web: [www.antisel.gr](http://www.antisel.gr)