



QuDye dsDNA HS Assay Kit manual

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

English: QuDye dsDNA HS Assay Kit manual	3-7
Deutsch: Handbuch für das QuDye dsDNA HS Kit	8-12
Русский: Инструкция к набору QuDye dsDNA HS для определения количества двухцепочечной ДНК	13-17

QuDye dsDNA HS Assay Kit manual

The kit is used for quantification of dsDNA with Fluorometer.

QuDye dsDNA HS reagent selectively binds to double-stranded DNA, so nucleotides, single-stranded DNA, RNA, proteins, and other impurities do not impede the measurements. All reagents are optimized to perform the measurements with fluorometer, the measurement range of initial sample DNA concentrations is from 10 pg/µL to 100 ng/µL.

Kit components

Kit component	Count			
	12102 assays	13102 assays	52102 assays	53102 assays
33010, QuDye dsDNA HS Reagent, 200x, 250 µL	1	1	—	—
B9650, Quantitative standard, 0 ng/uL in TE buffer, 1 mL	1	1	—	—
B7650, dsDNA quantitative standard, 10 ng/uL in TE buffer, 1 mL	1	1	—	—
G2150, TE buffer, 20x, 5 mL	1	1	—	—
33115, Polypropylene tube (0.5 mL thin-walled transparent), 100 pcs	—	1	—	5
63010, QuDye dsDNA HS Reagent, 200x, 1.25 mL	—	—	1	1
G9650, Quantitative standard, 0 ng/uL in TE buffer, 5 mL	—	—	1	1
G7650, dsDNA quantitative standard, 10 ng/uL in TE buffer, 5 mL	—	—	1	1
N2150, TE buffer, 20x, 25 mL	—	—	1	1

Store at 4 °C. Warm to RT before use.

Shelf life 12 months.

! All measurements with QuDye dsDNA HS Assay Kit should be performed at room temperature (22–28 °C). Before starting, equilibrate all kit's solutions to room temperature. Avoid warming the samples, as the sample temperature influences the measurement results; particularly do not hold the assay tubes in your hands just before fluorescence measurement with a fluorometer.

Protocol

1. Prepare 1x TE buffer taking into account that 200 µL of 1x TE buffer will be required for each sample and for each of the two standards. In order to do that, dilute 20x *TE concentrate* 20-fold with deionized water.
2. Prepare *QuDye dsDNA HS dye working solution* taking into account that 200 µL of dye working solution will be required for each sample and for each of the two standards. In order to do that, dilute *QuDye dsDNA HS reagent concentrate* 200-fold with *1x TE buffer*.

For example, to measure 3 samples and 2 standards, prepare 200 µL x 5 = 1000 µL of 1x TE buffer and 1000 µL of dye working solution (mix 5 µL of QuDye dsDNA HS reagent concentrate and 995 µL of 1x TE buffer).

! It is recommended to use dye working solution within several hours after preparation. In case of postponed measurements protect prepared dye working solution from light.

! Use only plastic containers to prepare dye working solution, as QuDye dsDNA HS reagent can adsorb to glass surfaces, which results in decreasing of the dye concentration in samples and biases in the measurement results.

3. Set up two 0.5 ml tubes (thin-walled and optical-transparent) for the standards and one tube for each sample. Label the tube lids. Do not label the side of the tube as this can interfere with the sample read.
4. To each of two tubes for standards add 190 µL of *QuDye dsDNA HS dye working*

solution and either 10 µL of Quantitative standard, 0 ng/µL (Standard #1) or dsDNA quantitative standard, 10 ng/µL (Standard #2). Vortex for 2–3 seconds and centrifuge briefly.

5. To each tube for samples add 180–199 µL of *QuDye dsDNA HS dye working solution* and 20–1 µL of DNA sample, respectively (the total volume should be 200 µL). Vortex for 2–3 seconds and centrifuge briefly.

Dilution of the experimental sample is optional and depends on its initial concentration. The initial sample concentration can vary from 10 pg/µL to 100 ng/µL; however, after diluting with QuDye dsDNA HS dye working solution the amount of DNA should correspond to the measurement range of fluorometer (0.2–100 ng of DNA in 200 µL of the test sample). Therefore, a sample with the minimal acceptable initial DNA concentration (10 pg/µL) should be diluted 10-fold to 1 pg/µL [put 180 µL of dye working solution and 20 µL of the sample (10 pg/µL) in the assay tube, which corresponds to 0.2 ng of DNA]. A sample with the maximal acceptable initial DNA concentration (100 ng/µL) should be diluted 200-fold [put 199 µL of dye working solution and 1 µL of the sample (100 ng/mL) in the assay tube, which corresponds to 100 ng of DNA]. However, avoid using too small volumes when diluting the initial sample in order to maintain accuracy and precision of your measurements.

6. Incubate all tubes (containing standards and DNA samples) for 3–5 minutes at room temperature.
7. Perform the fluorescence measurements.

Fluorescence measurement with a fluorometer

The next steps should be carried out according to the manual of the fluorometer. Depending on the version of the fluorometer the menu items may differ from the specified below.

1. On the Home screen of the fluorometer, choose **DNA** as the assay type, then **dsDNA High Sensitivity**.
2. The software will automatically switch to the **Standards** tab. It is recommended to run fluorometer calibration whenever preparing a new dye working solution. You can use the previous calibration that you have performed before if all experiment conditions, including temperature in your laboratory, remain unchanged. In this case, press **No** on the **Standards** tab, and the software will switch to the **Sample** tab to measure fluorescence of the experimental samples. Proceed to item 3.

To run new calibration, press **Yes** in the **Standards** tab. Insert the tube containing Standard #1 into the sample chamber, close the lid, then press **Read**. When reading is complete (~3 seconds), remove Standard #1. Insert the tube containing Standard #2 into the sample chamber, close the lid, then press **Read**. When reading is complete, remove Standard #2. When calibration is complete, the software will proceed to the **Sample** tab to measure fluorescence intensity of the experimental samples.

3. In the **Sample** tab, insert the tube containing the experimental sample into the sample chamber, close the lid, then press **Read**. When measurement is complete, the software will show the QF value on the screen.

The QF value is DNA concentration after dilution of the initial sample in the assay tube. Calculate the initial DNA concentration using the formula:

Concentration of DNA in the initial sample (ng/mL) = QF value × 200/V,
where

- V (μ L) is volume of the initial sample that was added to the assay tube (1–20 μ L);
- QF is the measurement result on the fluorometer screen (ng/mL).

Repeat the procedure for all experimental samples.

To calculate DNA concentration in the initial sample you can also use **Dilution Calculator** in the fluorometer.

Handbuch für das QuDye dsDNA HS Kit

Dieses Kit dient der Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA mit dem Fluorometer. QuDye dsDNA HS Reagenz bindet selektiv an doppelsträngige DNA, sodass Nukleotide, einzelsträngige DNA, RNA, Proteine und andere Verunreinigungen keinen Einfluss auf die Messergebnisse haben. Alle Reagenzien sind für die Messungen mit Fluorometer optimiert, der Messbereich für die Ausgangskonzentrationen der DNA-Proben reicht von 10 pg/µl bis 100 ng/µl.

Bestandteile

Komponente	Anzahl			
	12102	13102	52102	53102
	100	100	500	500
	assays	assays	assays	assays
33010, QuDye dsDNA HS Reagent, 200x, 250 µL	1	1	—	—
B9650, Standard / Quantitative standard, 0 ng/µl in TE-Puffer, 1 mL	1	1	—	—
B7650, dsDNA-Standard / dsDNA quantitative standard, 10 ng/µl in TE-Puffer, 1 mL	1	1	—	—
G2150, TE-Puffer, 20x, 5 mL	1	1	—	—
33115, Polypropylen-Gefäß (dünnwandiges transparentes 0,5 mL), 100 pcs	—	1	—	5
63010, QuDye dsDNA HS Reagent, 200x, 1.25 mL	—	—	1	1
G9650, Standard / Quantitative standard, 0 ng/µl in TE-Puffer, 5 mL	—	—	1	1
G7650, dsDNA-Standard / dsDNA quantitative standard, 10 ng/µl in TE-Puffer, 5 mL	—	—	1	1
N2150, TE-Puffer, 20x, 25 mL	—	—	1	1

Bei 4 °C lagern. Reagenzien vor Gebrauch auf +20 °C temperieren.

Haltbarkeit: 12 Monate.

! Alle Messungen mit QuDye dsDNA HS Kit werden bei Raumtemperatur (22–28 °C) ausgeführt. Bringen Sie vor Arbeitsbeginn alle Komponente des Kits auf Raumtemperatur. Vermeiden Sie die Erwärmung der Proben, denn die Temperatur der Proben beeinflusst Messergebnisse, insbesondere halten Sie die Röhrchen nicht in den Händen unmittelbar vor den Fluoreszenzmessungen mit Fluorometer.

Verfahren

1. Setzen Sie 1x TE-Puffer an, wobei für jede Probe und jeden Standard 200 µL 1x TE-Puffer benötigt werden. Den 1x TE-Puffer erhalten Sie, indem Sie 20x TE Konzentrat mit deionisiertem Wasser 20-fach verdünnen.
2. Setzen Sie QuDye dsDNA HS Farbstoffarbeitslösung an, wobei für jede Probe und jeden Standard 200 µL Farbstoffarbeitslösung benötigt werden. Die Farbstoffarbeitslösung erhalten Sie, indem Sie 200x QuDye dsDNA HS Farbstoffkonzentrat mit 1x TE-Pufferlösung 200-fach verdünnen.

Zur Messung von 3 Proben und 2 Standards stellen Sie beispielsweise 200 µL x 5 = 1000 µL 1x TE-Puffer und 1000 µL Farbstoffarbeitslösung her (legen Sie 5 µL QuDye dsDNA HS Farbstoffkonzentrat und 995 µL 1x TE-Pufferlösung vor).

! Die angesetzte Farbstoffarbeitslösung ist innerhalb von wenigen Stunden aufzubrauchen. Erfolgt die Messung nicht sofort, lagern Sie die angesetzte Farbstoffarbeitslösung lichtgeschützt.

! Verwenden Sie zur Herstellung der Farbstoffarbeitslösung ausschließlich Kunststoffgefäß. Ein Glasgefäß kann den Farbstoff adsorbieren, was zur Verringerung der Farbstoffkonzentration in den Proben und Beeinflussung der Messergebnisse führen kann.

3. Bereiten Sie 2 dünnwandige, optisch durchlässige 0,5-ml-Röhrchen für die Standards und ein Röhrchen je Probe vor. Beschriften Sie die Röhrchendeckel (nicht jedoch die Röhrchenwand, da dies das korrekte Ablesen der Probe stören

kann).

4. Pipettieren Sie in jedes Standardröhrchen 190 µl QuDye dsDNA HS Farbstoffarbeitslösung und 10 µl Quantitative standard, 0 ng/µl (Standard #1) bzw. dsDNA quantitative standard, 10 ng/µl (Standard #2). Vortexen Sie für 2–3 Sekunden und zentrifugieren Sie kurz an.
5. Pipettieren Sie in jedes Probenröhrchen 180–199 µl QuDye dsDNA HS Farbstoffarbeitslösung und 20–1 µl DNA-Probe (Das Endvolumen muss 200 µL betragen). Vortexen Sie für 2–3 Sekunden und zentrifugieren Sie kurz an.

Die Verdünnung der DNA-Probe ist optional und hängt von der Ausgangskonzentration ab. Die Ausgangskonzentration der DNA-Proben kann im Bereich von 10 pg/µl bis 100 ng/µl liegen. Die Endmenge der DNA sollte jedoch nach Verdünnung der Ausgangsprobe mit QuDye dsDNA HS Farbstoffarbeitslösung innerhalb des Messbereichs vom Fluorometer liegen, d. h. 0,2–100 ng in 200 µl der zu messenden DNA-Probe. Somit muss die Ausgangsprobe mit einer minimal zulässigen DNA-Ausgangskonzentration von 10 pg/µl 10-fach auf 1 pg/µl verdünnt werden (mischen Sie dafür in einem Probenröhrchen 180 µl der Farbstoffarbeitslösung und 20 µl der Ausgangsprobe mit 10 pg/µl, was 0,2 ng DNA entspricht); die Ausgangsprobe mit einer maximal zulässigen DNA-Ausgangskonzentration von 100 ng/µl muss 200-fach verdünnt werden (mischen Sie dafür in einem Probenröhrchen 199 µl der Farbstoffarbeitslösung mit 1 µl der Ausgangsprobe mit 100 ng/µl, das entspricht 100 ng DNA). Dabei sollten kleine Pipettervolumina zur Verdünnung der Ausgangsprobe vermieden werden, um die Genauigkeit und Präzision der Messungen zu gewährleisten.

6. Inkubieren Sie alle Röhrchen (mit Standards und DNA-Proben) für 3–5 Minuten bei Raumtemperatur.
7. Führen Sie Fluoreszenzmessungen durch.

Fluoreszenzmessung mit Fluorometer

Führen Sie die nachfolgenden Schritte gemäß der Anleitung für das Fluorometer durch. Je nach Ausführung des Fluorometers können sich Menüpunkte von den unten genannten unterscheiden.

1. Schalten Sie das Gerät ein und wählen Sie den Menüpunkt **DNA**, danach **dsDNA High Sensitivity**.
2. Das Gerät öffnet automatisch die Registerkarte **Standards**. Das Fluorometer ist nach jedem Ansetzen einer frischen Farbstoffarbeitslösung neu zu kalibrieren. Sie dürfen aber auch eine zuletzt gespeicherte Kalibrierung benutzen, wenn alle Messbedingungen inklusive der Temperatur im Labor gleich geblieben sind.
Drücken Sie in diesem Fall **No** in der Registerkarte **Standards**. Das Gerät öffnet jetzt die Registerkarte **Sample**, in der nun die Fluoreszenzmessung der Proben erfolgen kann. Gehen Sie zum Schritt 3 über.

Um das Gerät neu zu kalibrieren, drücken Sie in der Registerkarte **Standards** auf **Yes**. Setzen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #1* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie **Read**. Entfernen Sie nach Ablesen der Messwerte (etwa 3 Sekunden) das Röhrchen mit dem *Standard #1*. Setzen Sie nun das Röhrchen mit dem *Standard #2* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie **Read**. Entfernen Sie nach Ablesen der Messwerte das Röhrchen mit dem *Standard #2*. Nach Abschluss der Kalibrierung öffnet das Gerät die Registerkarte **Sample**, in der nun die Fluoreszenzmessung der Proben erfolgen kann.

3. Setzen Sie das Röhrchen mit der DNA-Probe in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie **Read** in der geöffneten Registerkarte **Sample**. Nach Abschluss der Messung wird auf dem Display der QF-Wert angezeigt.

Der QF-Wert gibt die DNA-Konzentration nach Verdünnung der Ausgangsprobe in einem Probenröhrchen an. Sie können die DNA-Konzentration in der Ausgangsprobe anhand der folgenden Formel berechnen:

DNA-Ausgangsprobenkonzentration (ng/ml) = QF-Wert x 200/V, wo

- V (μ l) – Volumen der Ausgangsprobe, das ins Probenröhrchen gegeben

wurde (1–20 µl),

- QF - Messwert auf dem Display des Fluorometers (ng/ml).

Wiederholen Sie den Vorgang für alle zu messenden Proben.

Sie können die DNA-Ausgangsprobenkonzentration auch über den Rechner am Fluorometer («Dilution Calculator») ausrechnen.

Инструкция к набору QuDye dsDNA HS для определения количества двухцепочечной ДНК

Набор предназначен для определения концентрации двухцепочечной ДНК на флуориметре. Благодаря селективному связыванию красителя QuDye dsDNA HS с двухцепочечной ДНК на результаты измерения не влияет присутствие в пробе нуклеотидов, одноцепочечной ДНК, РНК, белков и других примесей. Все поставляемые реагенты оптимизированы для работы на флуориметре, диапазон измеряемых концентраций ДНК составляет 10 пг/мкл–100 нг/мкл для исходного образца.

Состав набора

Компонент набора	Количество			
	12102 100 assays	13102 100 assays	52102 500 assays	53102 500 assays
33010, Краситель QuDye dsDNA HS / QuDye dsDNA HS Reagent, 200x, 250 µL	1	1	—	—
B9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в TE буфере, 1 mL	1	1	—	—
B7650, Стандарт дДНК / dsDNA quantitative standard, 10 ng/uL в TE буфере, 1 mL	1	1	—	—
G2150, Буфер TE, 20x, 5 mL	1	1	—	—
33115, Пробирка тонкостенная (0.5 mL прозрачный полипропилен), 100 pcs	—	1	—	5
63010, Краситель QuDye dsDNA HS / QuDye dsDNA HS Reagent, 200x, 1.25 mL	—	—	1	1
G9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в TE буфере, 5 mL	—	—	1	1
G7650, Стандарт дДНК / dsDNA quantitative standard, 10 ng/uL в TE буфере, 5 mL	—	—	1	1
N2150, Буфер TE, 20x, 25 mL	—	—	1	1

Хранить при температуре +4°C. Прогреть до +20°C перед использованием.

Срок хранения 12 месяцев.

! Все измерения с использованием набора QuDye dsDNA HS должны проводиться при комнатной температуре (22–28 °C). Перед началом работы прогрейте все используемые растворы до комнатной температуры. Избегайте нагрева образцов, так как результаты измерений зависят от температуры пробы; в частности, не держите в руках пробирки с образцами непосредственно перед измерениями на флуориметре.

Протокол

1. Приготовьте 1x TE буфер из расчета, что на каждый образец и на каждый из двух стандартов потребуется 200 мкл буфера. Для этого разведите 20x концентрат TE буфера в 20 раз деионизованной водой.
2. Приготовьте рабочий раствор красителя QuDye dsDNA HS из расчета, что на каждый образец и на каждый из двух стандартов потребуется около 200 мкл. Для этого разведите 200x концентрат красителя QuDye dsDNA HS в 200 раз 1x TE буфером.

Например, для измерения 3 образцов и 2 стандартов необходимо приготовить 200 мкл x 5 = 1000 мкл 1x TE буфера и 1000 мкл рабочего раствора красителя (смешайте 5 мкл концентрата красителя QuDye dsDNA HS и 995 мкл 1x TE буфера).

! Рабочий раствор красителя рекомендуется использовать в течение нескольких часов после приготовления. При проведении отсроченных измерений рекомендуется беречь от света готовый рабочий раствор красителя.

! Для приготовления рабочего раствора красителя используйте только пластиковую посуду. Стеклянная посуда может сорбировать на своих стенках краситель, что приведет к снижению концентрации красителя в образцах и искажению результатов измерений.

3. Подготовьте две тонкостенные, оптически прозрачные 0,5 мл пластиковые

пробирки для стандартов и по одной пробирке для каждого измеряемого образца. Подпишите крышки пробирок (не делайте пометок на стенках пробирок, так как это может привести к некорректному определению интенсивности флуоресценции).

4. В каждую пробирку для стандартов внесите 190 мкл *рабочего раствора красителя QuDye dsDNA HS* и 10 мкл *стандарта, 0 нг/мкл (стандарт #1)* и *стандарта дЦДНК, 10 нг/мкл (стандарт #2)* соответственно. Перемешайте на вортексе 2–3 секунды, сбросьте капли центрифугированием.
5. В каждую пробирку для образцов внесите 180–199 мкл *рабочего раствора красителя QuDye dsDNA HS* и 20–1 мкл образца соответственно (конечный объём в каждой пробирке должен составить 200 мкл). Перемешайте на вортексе 2–3 секунды, сбросьте капли центрифугированием.

Разведение исследуемого образца опционально и зависит от его исходной концентрации. Исходная концентрация образца может находиться в диапазоне 10 пг/мкл—100 нг/мкл; однако после разведения образца в рабочем растворе красителя QuDye dsDNA HS количество ДНК должно соответствовать диапазону измерения флуориметра: 0,2–100 нг ДНК в 200 мкл образца для измерения. Таким образом, образец с минимально допустимой исходной концентрацией ДНК 10 пг/мкл следует разбавить в 10 раз до 1 пг/мкл (в пробирку для измерения внесите 180 мкл рабочего раствора красителя и 20 мкл образца 10 пг/мкл, что соответствует 0,2 нг ДНК), а образец с максимально допустимой исходной концентрацией ДНК 100 нг/мкл следует разбавить в 200 раз (в пробирку для измерения внесите 199 мкл рабочего раствора красителя и 1 мкл образца 100 нг/мкл, что соответствует 100 нг). В то же время следует избегать использования маленьких объёмов при разбавлении исходного образца, поскольку неточность пипетирования маленьких объёмов может сказаться на результатах измерений.

6. Инкубуируйте все пробирки (содержащие стандарты и исследуемые образцы) 3–5 минут при комнатной температуре.
7. Проведите измерение интенсивности флуоресценции.

Измерение интенсивности флуоресценции на флуориметре

Измерение интенсивности флуоресценции следует выполнять согласно инструкции к флуориметру. В зависимости от версии флуориметра пункты меню могут отличаться от приведенных ниже.

1. После включения прибора выберите пункт **DNA**, затем **dsDNA High Sensitivity**.
2. Прибор автоматически переключится во вкладку **Standards**. При каждом новом приготовлении рабочего раствора красителя рекомендуется проводить новую калибровку флуориметра. Вы можете воспользоваться старой калибровкой, которую Вы проводили ранее, если все условия эксперимента, включая температуру в лаборатории, остались неизменными. В таком случае, находясь во вкладке **Standards**, нажмите **No**, и прибор перейдет во вкладку **Sample** для измерения интенсивности флуоресценции экспериментальных образцов. Переходите к п. 3.

Для снятия новой калибровки, находясь во вкладке **Standards**, нажмите **Yes**. Поместите в гнездо пробирку, содержащую *стандарт #1*, закройте крышку, нажмите **Read**. Когда прибор проведет измерение (около 3 сек), удалите пробирку со *стандартом #1*. Поместите в гнездо пробирку, содержащую *стандарт #2*, закройте крышку, нажмите **Read**. Когда прибор проведет измерение, удалите пробирку со *стандартом #2*. После завершения калибровки прибор перейдет во вкладку **Sample** для измерения интенсивности флуоресценции экспериментальных образцов.

3. Находясь во вкладке **Sample**, поместите в гнездо пробирку с экспериментальным образцом, закройте крышку, нажмите **Read**. После завершения измерения прибор покажет на экране значение **QF**. Значение QF представляет собой концентрацию ДНК после разбавления исходного образца в пробирке для измерения. Рассчитайте исходную концентрацию ДНК по формуле:

Концентрация ДНК в исходном образце (нг/мл) = значение QF x 200/V,
где

- V (мкл) — объем исходного образца, который был добавлен в пробирку для измерения (1–20 мкл),
- QF — результат измерения на экране флуориметра (нг/мл).

Повторите процедуру для всех экспериментальных образцов.

Для расчета концентрации ДНК в исходном образце Вы также можете воспользоваться калькулятором на флуориметре («Dilution Calculator»).

Ver. IPVPW
#5555E



22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

