



Инструкция к набору QuDye® dsDNA HS  
для определения количества  
двухцепочечной ДНК



## Contents

|   |     |
|---|-----|
| Русский: Инструкция к набору QuDye® dsDNA HS для<br>определения количества двухцепочечной ДНК ..... | 3-8 |
|---|-----|

# 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            |                       |                        |                        |                        |                        |                        |                        |                        |                        |                         |                         |
|---|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|   | A2102<br>10<br>assays | S2102<br>10<br>assays | T2102<br>100<br>assays | 22102<br>100<br>assays | 23102<br>100<br>assays | 13102<br>100<br>assays | 52102<br>500<br>assays | 53102<br>500<br>assays | 54102<br>500<br>assays | 55102<br>500<br>assays | 72102<br>1000<br>assays | 74102<br>1000<br>assays |
| A3250, Буфер TE, 1x, 5 mL   | —                     | 1                     | —                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                       | —                       |
| A3010, Краситель QuDye® dsDNA HS / QuDye® dsDNA HS Reagent, 200x, 30 µL           | 1                     | 1                     | —                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                       | —                       |
| B9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в TE буфере, 1 mL               | 1                     | 1                     | 1                      | 1                      | 1                      | 1                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                       | —                       |
| G2150, Буфер TE, 20x, 5 mL  | 1                     | —                     | 1                      | —                      | —                      | 1                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                       | —                       |
| A7650, Стандарт дцДНК / dsDNA quantitative standard, 10 нг/µL в TE буфере, 100 µL | 1                     | 1                     | —                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                      | —                       | —                       |

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 33010,<br>Краситель<br>QuDye®<br>dsDNA HS /<br>QuDye®<br>dsDNA HS<br>Reagent,<br>200×, 250 µL     | — | — | 1 | 1 | 1 | 1 | — | — | — | — | — | —  |
| B7650,<br>Стандарт<br>дцДНК / dsDNA<br>quantitative<br>standard, 10<br>ng/µL в TE<br>буфере, 1 mL | — | — | 1 | 1 | 1 | 1 | — | — | — | — | — | —  |
| S3250, Буфер<br>TE, 1x, 50 mL   | — | — | — | 1 | 1 | — | — | — | 5 | 5 | — | 20 |
| 33115,<br>Пробирка<br>тонкостенная<br>(0.5 mL<br>прозрачный<br>полипропилен),<br>100 pcs          | — | — | — | — | 1 | 1 | — | 5 | — | 5 | — | —  |
| 63010,<br>Краситель<br>QuDye®<br>dsDNA HS /<br>QuDye®<br>dsDNA HS<br>Reagent,<br>200×, 1.25 mL    | — | — | — | — | — | — | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2  |
| G9650,<br>Стандарт /<br>Quantitative<br>standard, 0<br>нг/мкл в TE<br>буфере, 5 mL                | — | — | — | — | — | — | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2  |
| G7650,<br>Стандарт<br>дцДНК / dsDNA<br>quantitative<br>standard, 10<br>ng/µL в TE<br>буфере, 5 mL | — | — | — | — | — | — | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2  |
| N2150, Буфер<br>TE, 20x, 25 mL  | — | — | — | — | — | — | 1 | 1 | — | — | 2 | —  |

Хранить при температуре +4°C. Прогреть до комнатной температуры перед использованием. Транспортировка: до трех недель при комнатной температуре.

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. Если набор укомплектован 20× концентратом ТЕ буфера, приготовьте 1× ТЕ буфер из расчета, что на каждый образец и на каждый из двух стандартов потребуется 200 мкл буфера. Для этого разведите 20× концентрат ТЕ буфера в 20 раз деионизованной водой. В случае использования комплекта набора с однократным буфером (S2102, 22102, 23102, 54102, 55102, 74102) разведение не требуется.

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 200× концентрат красителя QuDye® dsDNA HS в 200 раз 1× ТЕ буфером.

*Например, для измерения 3 образцов и 2 стандартов необходимо приготовить 200 мкл  $\times$  5 = 1000 мкл 1× ТЕ буфера и 1000 мкл рабочего раствора*

*красителя (смешайте 5 мкл концентрата красителя QuDye® dsDNA HS и 995 мкл 1х ТЕ 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. Стеклоянная 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. Инкубируйте 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.

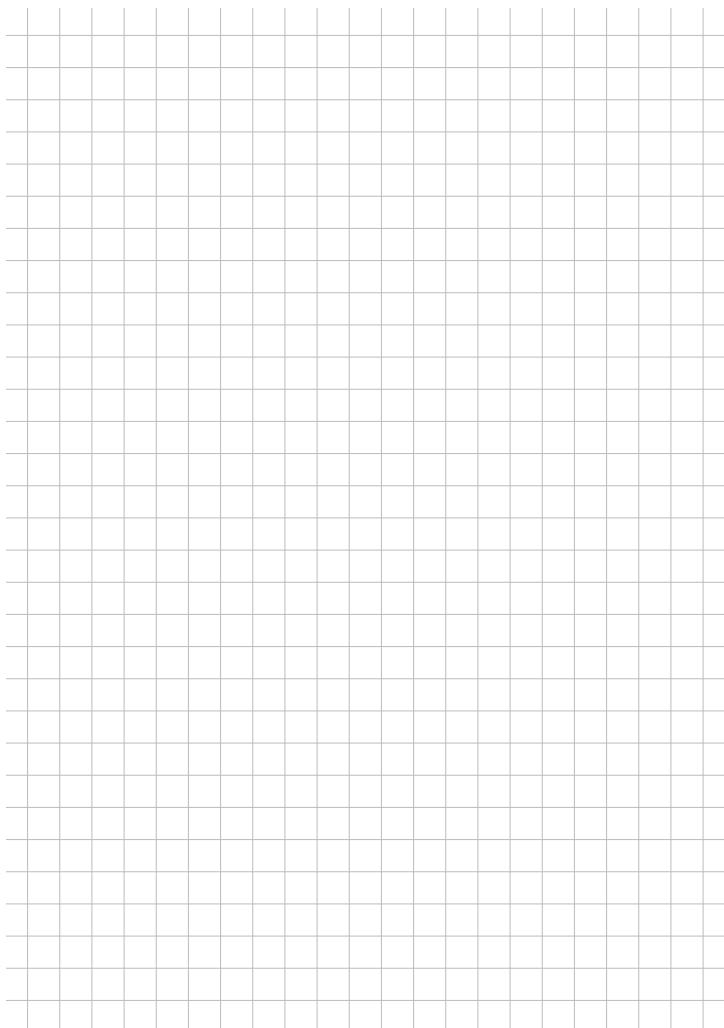
Значение QF представляет собой концентрацию ДНК после разбавления исходного образца в пробирке для измерения. Рассчитайте исходную концентрацию ДНК по формуле:

**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»).







22.09.509-QM  
Issued by INSPECT



[www.lumiprobe.com](http://www.lumiprobe.com)