Lumiprobe
Life science solutions

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

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору QuDye® dsDNA HS для определения количества двухцепочечной ДНК 3-8

RU

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 10 assays	12102 100 assays	22102 100 assays	13102 100 assays	52102 500 assays	72102 1000 assays	53102 500 assays
A3010, Краситель QuDye® dsDNA HS / QuDye® dsDNA HS Reagent, 200×, 30 uL	1	—	—	—	—	—	—
A7650, Стандарт дцДНК / dsDNA quantitative standard, 10 ng/uL в TE буфере, 100 uL	1	—	—	—	—	—	—
S3250, Буфер TE, 1x, 50 mL	—	—	1	—	—	—	—
B9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в TE буфере, 1 mL	1	1	1	1	—	—	—
G2150, Буфер TE, 20x, 5 mL	1	1	—	1	—	—	—

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

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. 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. 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»).

Ver. MZ8UM
#5555E

22.09.509-QM
Issued by INSPECT

www.lumiprobe.com