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 3-7

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			
	12102 100 assays	13102 100 assays	52102 500 assays	53102 500 assays
33010, Краситель QuDye dsDNA HS / QuDye dsDNA HS Reagent, 200×, 250 uL	1	1	—	—
B9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в ТЕ буфере, 1 mL	1	1	—	—
B7650, Стандарт дцДНК / dsDNA quantitative standard, 10 ng/uL в ТЕ буфере, 1 mL	1	1	—	—
G2150, Буфер ТЕ, 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, 200×, 1.25 mL	—	—	1	1
G9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в ТЕ буфере, 5 mL	—	—	1	1
G7650, Стандарт дцДНК / dsDNA quantitative standard, 10 ng/uL в ТЕ 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. 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. IPVPW
#5555E

22.09.509-QM
Issued by INSPECT

www.lumiprobe.com