Lumiprobe
Life science solutions

Инструкция к набору QuDye dsDNA BR для определения количества двухцепочечной ДНК

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

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

RU

Инструкция к набору QuDye dsDNA BR для определения количества двухцепочечной ДНК

Набор QuDye dsDNA BR (Broad Range) предназначен для определения концентрации двухцепочечной ДНК на флуориметре . Краситель QuDye dsDNA BR селективно связывается с двухцепочечной ДНК, поэтому присутствующие в образце примеси РНК, одноцепочечной ДНК, нуклеотидов и белков не влияют на результаты измерений. Другие примеси в незначительном количестве, такие как соли, детергенты и растворители оказывают несущественное влияние на результаты измерений, однако рекомендуется минимизировать или полностью исключить их присутствие в образце. Все поставляемые реагенты оптимизированы для работы на флуориметре в диапазоне исходной концентрации ДНК от 100 пг/мкл до 1000 нг/мкл (количество ДНК после разбавления исходного образца составляет 2–1000 нг в 200 мкл образца для измерения). Все измерения выполняются при комнатной температуре, уровень флуоресценции образцов стабилен в течение 3 часов.

Для определения в образце ДНК примеси белка набор QuDye dsDNA BR можно использовать в сочетании с набором QuDye для определения количества белка.

Состав набора

Компонент набора	Количество						
	A9102 10 assays	19102 100 assays	1Z102 100 assays	59102 500 assays	69102 500 assays	89102 1000 assays	79102 1000 assays
28010, Краситель QuDye dsDNA BR / QuDye dsDNA BR Reagent, 200x, 30 uL	1	—	—	—	—	—	—

AA650, dsDNA quantitative standard, 100 ng/uL in TE buffer, 100 uL	1	—	—	—	—	—	—
K9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в TE буфере, 10 mL	—	—	—	—	—	1	—
KA650, dsDNA quantitative standard, 100 ng/uL in TE buffer, 10 mL	—	—	—	—	—	1	—
B9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в TE буфере, 1 mL	1	1	1	5	5	—	10
S4850, Буфер QuDye BR, 1x, 50 mL	1	1	1	5	5	10	10
38010, Краситель QuDye dsDNA BR / QuDye dsDNA BR Reagent, 200x, 250 uL	—	1	1	—	—	—	—
BA650, dsDNA quantitative standard, 100 ng/uL in TE buffer, 1 mL	—	1	1	5	5	—	10
33115, Пробирка тонкостенная (0.5 mL прозрачный полипропилен), 100 pcs	—	—	1	—	5	—	—
68010, Краситель QuDye dsDNA BR / QuDye dsDNA BR Reagent, 200x, 1.25 mL	—	—	—	1	1	2	2

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

Срок хранения 12 месяцев.

! Все измерения с использованием набора QuDye dsDNA BR должны проводиться при комнатной температуре (22–28°C). Перед началом работы тщательно прогрейте все используемые растворы до комнатной температуры. При регулярном использовании набора рекомендуется хранить краситель QuDye dsDNA BR и буфер QuDye BR при комнатной температуре, стандарты при температуре +4°C.

! Обращаем Ваше особое внимание на то, что колебания температуры образца оказывают значительное влияние на результаты измерений. Избегайте нагрева образцов, в частности, не держите в руках пробирки с образцами непосредственно перед измерениями на флуориметре. Поскольку даже кратковременное нахождение пробирки с образцом в гнезде флуориметра способствует нагреву образца, проводите измерения флуоресценции сразу после того, как поместите пробирку с образцом в гнездо флуориметра. При необходимости повторного измерения одного и того же образца, следует извлекать пробирку с образцом из флуориметра сразу после измерения и помещать образец в гнездо флуориметра только на период измерения интенсивности флуоресценции.

Протокол

1. Приготовьте рабочий раствор *красителя QuDye dsDNA BR* из расчета, что на каждый образец и на каждый из двух стандартов потребуется около 200 мкл. Для этого разведите 200× концентрат *красителя QuDye dsDNA BR* в 200 раз *буфером QuDye BR*.

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

   ! 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.

2. Подготовьте две тонкостенные, оптически прозрачные пластиковые пробирки для стандартов объёмом 0,5 мл 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).

3. В каждую пробирку для стандартов внесите 190 мкл *рабочего раствора красителя QuDye dsDNA BR* и 10 мкл *стандарта #1 (стандарт, 0 нг/мкл)* и *стандарта #2 (стандарт дцДНК, 100 нг/мкл)* соответственно. Перемешайте на вортексе 2–3 секунды, сбросьте капли.

4. В каждую пробирку для образцов внесите 180–199 мкл *рабочего раствора красителя QuDye dsDNA BR* и 20–1 мкл образца соответственно (конечный объём в каждой пробирке должен составить 200 мкл). Перемешайте на вортексе 2–3 секунды, сбросьте капли. Проследите, чтобы в пробирке не образовались пузыри — при необходимости избавьтесь от пузырей центрифугированием.

   Разведение исследуемого образца опционально и зависит от его исходной концентрации. Исходная концентрация образца может находиться в диапазоне 100 пг/мкл–1000 нг/мкл; однако после разведения образца в рабочем растворе красителя QuDye dsDNA BR количество ДНК должно соответствовать диапазону измерения флуориметра: 2–1000 нг ДНК в 200 мкл образца для измерения. Таким образом, образец с минимально допустимой исходной концентрацией ДНК 100 пг/мкл следует разбавить в 10 раз до 10 пг/мкл (в пробирку для измерения внесите 180 мкл рабочего раствора красителя и 20 мкл образца 100 пг/мкл, что соответствует 2 нг ДНК), а образец с максимально допустимой исходной концентрацией ДНК 1000 нг/мкл следует разбавить в 200 раз (в пробирку для измерения внесите 199 мкл рабочего раствора красителя и 1 мкл образца 1000 нг/мкл, что соответствует 1000 нг). В то же время следует избегать использования маленьких объёмов при разбавлении исходного образца, поскольку неточность пипетирования маленьких объёмов может сказаться на результатах измерений.

5. Инкубируйте все пробирки (содержащие стандарты и исследуемые образцы)

3–5 минут при комнатной температуре.

6. 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 приведённых ниже.

1. После включения прибора выберите пункт **DNA**, затем **dsDNA Broad Range**.
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 (стандарт, 0 нг/мкл)*, закройте крышку, нажмите **Read**. Когда прибор проведет измерение (около 3 сек), удалите пробирку со *стандартом #1*. Поместите в гнездо пробирку, содержащую *стандарт #2 (стандарт дцДНК, 100 нг/мкл)*, 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 (мкг/мл) = значение QF x 200/V, где

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

Повторите процедуру для всех экспериментальных образцов.

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

Ver. KNSEI
#5555F

22.09.509-QM
Issued by INSPECT

www.lumiprobe.com