Lumiprobe
Life science solutions



Инструкция к набору QuDye® ssDNA для определения количества одноцепочечной ДНК

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору QuDye® ssDNA для определения количества одноцепочечной ДНК 3-8

RU

Инструкция к набору QuDye® ssDNA для определения количества одноцепочечной ДНК

Набор предназначен для определения концентрации одноцепочечной ДНК на флуориметре. С помощью данного набора может быть измерена концентрация как длинной одноцепочечной ДНК, так и коротких олигонуклеотидов; свободные нуклеотиды не связываются с красителем и не влияют на результаты измерений. Краситель QuDye® ssDNA не обладает селективностью по отношению к одноцепочечной ДНК и также связывает двухцепочечную ДНК и РНК, поэтому следует исключить их присутствие в образце. Другие примеси в незначительном количестве, такие как соли, детергенты, растворители, белки оказывают несущественное влияние на результаты измерений (Табл. 1), однако рекомендуется минимизировать или полностью исключить их присутствие в образце.

Все поставляемые реагенты оптимизированы для работы на флуориметре, диапазон измеряемых концентраций ДНК составляет 50 пг/мкл–200 нг/мкл для исходного образца (конечное содержание ДНК в пробирке после разбавления образца в рабочем растворе красителя 1–200 нг).

Состав набора

Компонент набора	Количество		
	A7102 10 assays	17102 100 assays	18102 100 assays
A5010, Краситель QuDye ssDNA / QuDye ssDNA Reagent, 200x, 30 uL	1	—	—
33115, Пробирка тонкостенная (0.5 mL прозрачный полипропилен), 100 pcs	—	—	1
B2650, Стандарт оцДНК / ssDNA quantitative standard, 20 ng/uL в TE буфере, 1 mL	1	1	1

B9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в ТЕ буфере, 1 mL	1	1	1
S3250, Буфер ТЕ, 1x, 50 mL	1	1	1
35010, Краситель QuDye ssDNA / QuDye ssDNA Reagent, 200x, 250 uL	—	1	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® ssDNA должны проводиться при комнатной температуре (22–28°C). Перед началом работы тщательно прогрейте все используемые растворы до комнатной температуры. При постоянном использовании набора рекомендуется хранить краситель QuDye® ssDNA и 1× буфер ТЕ 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® ssDNA* из расчета, что на каждый образец и на каждый из двух стандартов потребуется около 200 мкл. Для этого разведите 200× концентрат *красителя QuDye® ssDNA*

в 200 раз *1× TE буфером.*

Например, для измерения 3 образцов и 2 стандартов необходимо приготовить 200 мкл × 5 = 1 000 мкл рабочего раствора красителя (смешайте 5 мкл концентрата красителя QuDye® ssDNA и 995 мкл 1× 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 приведёт к снижению концентрации красителя в образцах и искажению результатов измерений.

2. Подготовьте две тонкостенные, оптически прозрачные пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл 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).
3. В каждую пробирку для стандартов внесите 190 мкл *рабочего раствора красителя QuDye® ssDNA* и 10 мкл *Quantitative standard, 0 ng/µL (Стандарт #1)* и *ssDNA quantitative standard, 20 ng/µL (Стандарт #2)* соответственно. Перемешайте на вортексе 2–3 секунды, сбросьте капли.
4. В каждую пробирку для образцов внесите 180–199 мкл *рабочего раствора красителя QuDye® ssDNA* и 20–1 мкл образца соответственно (конечный объём в каждой пробирке должен составить 200 мкл). Перемешайте на вортексе 2–3 секунды, сбросьте капли.

   Разведение исследуемого образца опционально и зависит от его исходной концентрации. Исходная концентрация образца должна соответствовать диапазону 50 пг/мкл–200 нг/мкл. Для измерений на флуориметре конечное содержание ДНК в пробирке после разбавления образца в рабочем растворе красителя должно находиться в диапазоне 1–200 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) 2 минуты при комнатной температуре.
6. Проведите измерение интенсивности флуоресценции.

Измерение интенсивности флуоресценции на флуориметре

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

1. После включения прибора выберите пункт **ssDNA**. Нажмите **Go**.
2. При каждом новом приготовлении рабочего раствора красителя следует проводить калибровку флуориметра. Выберете пункт **Run new calibration** и нажмите **Go**.
3. Поместите в гнездо пробирку, содержащую *стандарт #1*, закройте крышку, нажмите **Go**. Когда прибор проведет измерение (около 3 секунд), удалите пробирку со *стандартом #1*. Поместите в гнездо пробирку, содержащую *стандарт #2*, закройте крышку, нажмите **Go**. Когда прибор проведет измерение, удалите пробирку со *стандартом #2*.
4. После успешного завершения калибровки поместите в гнездо пробирку с экспериментальным образцом, закройте крышку, нажмите **Go**. На экране прибор покажет значение QF Value.

   Рассчитайте концентрацию ДНК по формуле: Концентрация ДНК в образце = значение QF × 200/объём образца; или введите объём образца в прибор.

Таблица 1. Влияние примесей на интенсивность флуоресценции при измерении концентрации одноцепочечной ДНК набором QuDye® ssDNA

Примеси	Конечная концентрация в измеряемом образце	Изменение интенсивности флуоресценции (увеличение ↑ или уменьшение ↓)	
Ацетат натрия	30 мМ	↓	Незначительное (менее 10%)
Агароза	0,1%	↑	
Хлороформ	2%	↑	
Ацетат аммония	50 мМ	↓	Умеренное (10-20%)
Фенол	0,2%	↓	
Этанол	10%	↑	
Тритон X-100	0,1%	↑	
Бычий сывороточный альбумин	2%	↑	Существенное (более 20%)
IgG	0,1%	↓	
Хлорид натрия	100 мМ	↓	
Хлорид цинка	1 мМ	↓	
Хлорид магния	5 мМ	↓	
Мочевина	2 М	↑	
SDS	0,01%	↑	
Полиэтиленгликоль	1%	↑	
АТФ	0,1%	↑	

Ver. QJP11
#5555D

22.09.509-QM
Issued by INSPECT

www.lumiprobe.com