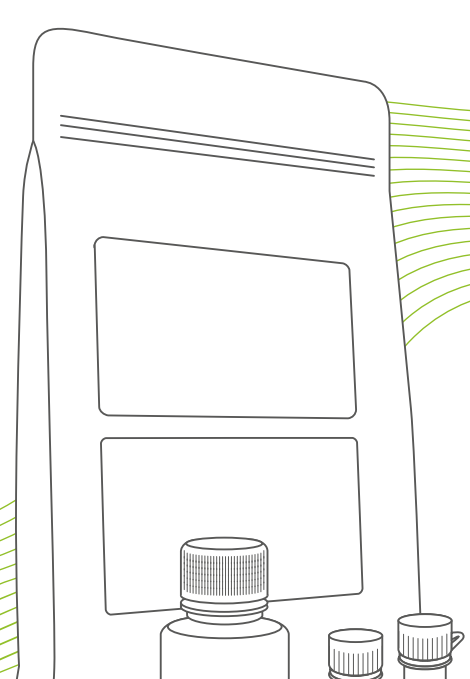
Lumiprobe
Life science solutions



Инструкция к набору PreciseGreen® для определения количества дцДНК

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору PreciseGreen® для определения количества дцДНК 3-9

RU

Инструкция к набору PreciseGreen® для определения количества дцДНК

Набор PreciseGreen® для определения количества ДНК предназначен для определения низких концентраций двухцепочечной ДНК (не определяемых спектрофотометрическим методом при длине волны 260 нм). Благодаря селективному связыванию красителя PreciseGreen® с двухцепочечной ДНК на результаты измерения не влияет присутствие в пробе нуклеотидов, одноцепочечной ДНК, РНК, белков и других примесей.

Линейный диапазон измерения концентрации ДНК с использованием набора составляет от 1 пг/мкл до 5 нг/мкл. Краситель, связанный с молекулой двухцепочечной ДНК, имеет максимум поглощения при длине волны 503 нм и максимум испускания при 525 нм. Для проведения измерений подойдет любой тип флуориметра.

Состав набора

Компонент набора	Количество		
	1102-20 20 assays	1102-200 200 assays	B1102 200 assays
AA650, Стандарт дцДНК / dsDNA quantitative standard, 100 нг/мкл в TE буфере, 100 uL	1	—	—
42010, Краситель PreciseGreen® для определения концентрации двухцепочечной ДНК, 200×, 1 mL	—	1	—
12010, Краситель PreciseGreen® для определения концентрации двухцепочечной ДНК, 200×, 100 uL	1	—	10
N2150, Буфер TE, 20x, 25 mL	1	1	1
BA650, Стандарт дцДНК / dsDNA quantitative standard, 100 нг/мкл в TE буфере, 1 mL	—	1	1

Хранить при температуре до +4 °C. Не замораживать! Транспортировка: до трех недель при комнатной температуре. Избегайте хранения на свету. Берегите от влаги.

Срок хранения 12 месяцев.

Указанное выше количество реагентов рассчитано для проведения 200 измерений при работе с объемом измеряемого образца 2 мл (минимально необходимый объём образца для измерений в стандартной флуориметрической кювете объёмом 3,5 мл). Количество измерений может варьироваться в зависимости от объема образца. Рекомендуемые объёмы образца для наиболее популярного флуориметрического оборудования представлены ниже в таблице.

Тип оборудования		**Общий объём образца ($V_{образца}$)**	**Объём рабочего раствора красителя PreciseGreen®**	**Объём экспериментального раствора ДНК**
Кюветный флуориметр	Стандартная флуориметрическая кювета (3,5 мл)	2 мл	1 мл	1 мл
	Другие флуориметрические кюветы	около 75% объёма кюветы	37,5% объёма кюветы	37,5% объёма кюветы
Планшетный флуориметр	96-луночный планшет*, на лунку	0,2 мл	0,1 мл	0,1 мл
	24-луночный планшет, на лунку	1 мл	0,5 мл	0,5 мл
	Другие планшеты	около 75% объёма лунки	37,5% объёма лунки	37,5% объёма лунки
Микрообъемный флуороспектрометр*		0,1 мл	0,05 мл	0,05 мл

** Для обеспечения точности измерений рекомендуется избегать дозирования объёмов менее 2 мкл.*

Протокол

! Чтобы нивелировать возможные ошибки дозирования, мы рекомендуем приготовить 1× TE буфер и рабочий раствор красителя PreciseGreen® с запасом 10–25%.

1. Приготовление 1× TE буфера

Приготовьте необходимое количество 1× буфера исходя из объёма образца и количества измеряемых образцов (включая 5 разведений стандартного раствора ДНК, см. п.3). Для получения 1× буфера разведите *20× концентрат TE буфера* в 20 раз деионизированной водой (уточните в таблице выше рекомендуемый объём образца для используемого оборудования).

Для расчета необходимого объёма буфера ($V_{1\times\ буфера}$) воспользуйтесь следующей формулой:

$V_{1\times\ буфера} = V_{образца} \times (N_{образцов} + 5)$,

где $V_{образца}$ — измеряемый объем исследуемого образца или стандарта, $N_{образцов}$ — количество измеряемых образцов, и 5 — количество измеряемых стандартов (включая образец с нулевой концентрацией ДНК).

2. Приготовление рабочего раствора красителя PreciseGreen®

Разморозьте и тщательно перемешайте содержимое пробирки с красителем. Приготовьте достаточное количество рабочего раствора красителя для всех образцов: объём рабочего раствора красителя должен составить 50% от общего объёма измеряемого образца. Для получения рабочего раствора красителя разведите *200× концентрат красителя PreciseGreen®* в 200 раз приготовленным 1× TE буфером.

! Готовый рабочий раствор красителя пригоден для использования в течение

3 часов.

Для расчета необходимого объёма рабочего раствора красителя ($V_{PreciseGreen®}$) воспользуйтесь следующей формулой:

$V_{PreciseGreen®} = 1/2 \times V_{образца} \times (N_{образцов} + 5)$,

где $V_{образца}$ — измеряемый объем исследуемого образца или стандарта, $N_{образцов}$ — количество измеряемых образцов, и 5 — количество измеряемых стандартов (включая образец с нулевой концентрацией ДНК).

***!** 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, как следствие, скажется на результатах измерений.*

3. Приготовление стандартных растворов ДНК

Приготовьте стоковый раствор ДНК с концентрацией 2 нг/мкл в 1× ТЕ буфере: внесите в пробирку 30 мкл *стандарта дцДНК* из набора и 1,47 мл 1× ТЕ буфера. Используя этот стоковый раствор, приготовьте стандартные растворы ДНК следующих концентраций: 2 нг/мкл, 200 пг/мкл, 20 пг/мкл, 2 пг/мкл (см. таблицу ниже).

! Предлагаемая схема разведений стандартного раствора ДНК дана с запасом на погрешности дозирования при приготовлении разведений с концентрацией ДНК 0–2 нг/мкл. Приготовленного по данной схеме стокового раствора ДНК объёмом 1,5 мл достаточно для приготовления стандартных растворов ДНК при проведении измерений в кювете 3,5 мл (объем образца 2 мл). При использовании меньшего объёма образца стоковый раствор ДНК может быть приготовлен в меньшем объёме.

Объем 1× ТЕ буфера, мкл	Объем стокового раствора ДНК 2 нг/мкл, мкл	Концентрация стандартного раствора ДНК	Конечная концентрация стандарта в измеряемом объеме
0	1 000	2 нг/мкл	1 нг/мкл
900	100	200 пг/мкл	100 пг/мкл
990	10	20 пг/мкл	10 пг/мкл
999	1	2 пг/мкл	1 пг/мкл
1 000	0	0 пг/мкл	0 пг/мкл

Смешайте каждый стандартный раствор ДНК с рабочим раствором красителя в соотношении 1:1 (конечный объём образца ($V_{образца}$) уточните в таблице выше). Перемешайте.

! При обнаружении нелинейности калибровочной кривой на границах динамического диапазона прибора скорректируйте концентрации стандартов для оптимального использования возможностей флуориметра.

4. Приготовление экспериментального образца

Разведите исследуемый образец ДНК в 1× ТЕ буфере таким образом, чтобы объём образца составил 50% измеряемого объема. Добавьте эквивалентный объем рабочего раствора красителя PreciseGreen®. Перемешайте.

! Исходный объём образца может быть любым, однако конечная концентрация ДНК после разбавления в 1× ТЕ буфере и добавления рабочего раствора красителя PreciseGreen® должна соответствовать диапазону 1 пг/мкл—5 нг/мкл.

5. Инкубируйте приготовленные растворы стандартов и экспериментального образца 5 минут при комнатной температуре

6. Измерение флуоресценции

Измерьте интенсивность флуоресценции стандартных растворов ДНК и экспериментальных образцов ДНК (краситель, связанный с молекулой двухцепочечной ДНК, имеет максимум поглощения при длине волны 503 нм и максимум испускания при 525 нм).

7. Расчёт концентрации ДНК

Постройте калибровочную кривую, используя данные об уровне флуоресценции стандартных растворов. Аппроксимируйте данные линейной функцией, найдите параметры функции A и B. Линейное уравнение зависимости флуоресценции (FL) от концентрации (C) выглядит следующим образом:

$FL = A \times C + B$, где FL — интенсивность флуоресценции в условных единицах, C — концентрация ДНК, A и B — параметры линейной функции.

Концентрация ДНК в экспериментальном образце:

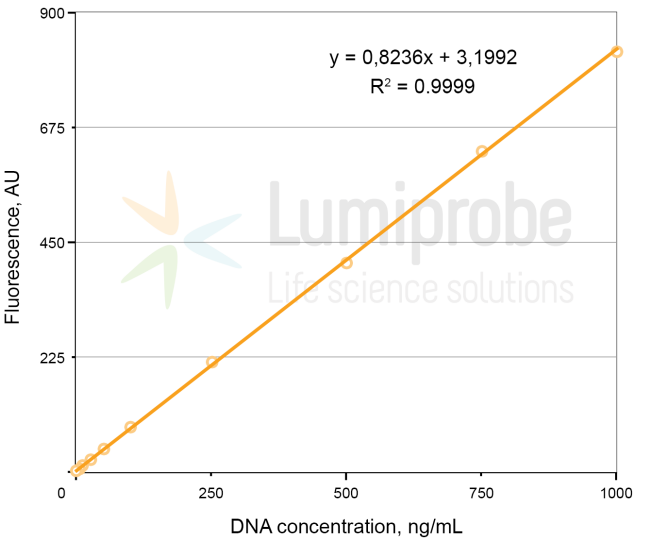
$C_{образца} = (FL_{образца} - B)/A$, где $FL_{образца}$ — флуоресценция образца, A и B — параметры найденной линейной функции.

Концентрация ДНК в исходном образце:

$C_{исх} = V_{образца} \times C_{образца}/V_{исх}$, где $V_{образца}$ — объём образца и $V_{исх}$ — объем исходного раствора ДНК, использованный для приготовления экспериментального образца.

Для проведения необходимых вычислений мы рекомендуем воспользоваться нашими калькуляторами: для расчета концентрации ДНК и приготовления/разбавления растворов.

Пример уравнения зависимости флуоресценции от концентрации ДНК:



Ver. QJB1A
#5555C

22.09.509-QM
Issued by INSPECT

www.lumiprobe.com