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	
	1102-200 200 assays	B1102 200 assays
42010, Краситель PreciseGreen для определения концентрации дцДНК, 200x, 1 mL	1	—
12010, Краситель PreciseGreen для определения концентрации дцДНК, 200x, 100 uL	—	10
N2150, Буфер TE, 20x, 25 mL	1	1
B8650, Стандарт дцДНК / dsDNA quantitative standard, 100 нг/мкл в TE буфере, 1 mL	1	1

Хранить при температуре до 4°C. Не замораживать!

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
NanoDrop™ 3300*		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× TE буфере: внесите в пробирку 30 мкл *стандарта дцДНК* из набора и 1,47 мл 1× TE 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× TE буфера, мкл	Объем стокового раствора ДНК 2 нг/мкл, мкл	Концентрация стандартного раствора ДНК	Конечная концентрация стандарта в измеряемом объеме
0	1000	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
1000	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× TE 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× TE 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:

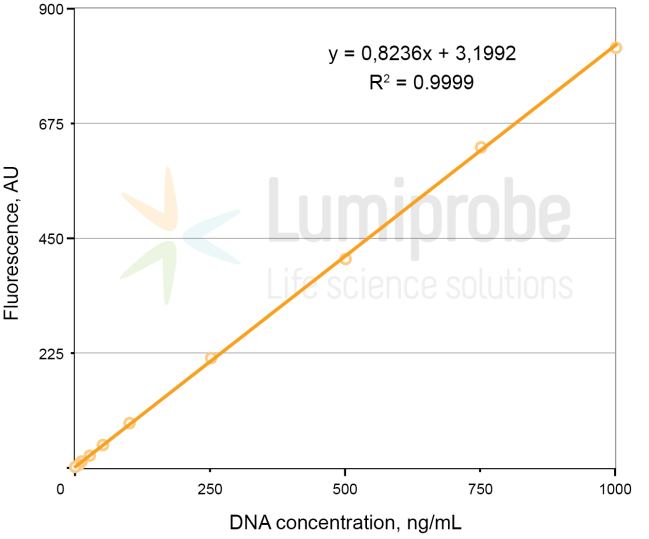
$C_{образца} = (FL_{образца} - B)/A$, где $FL_{образца}$ — флуоресценция образца, A и B — параметры найденной линейной функции.

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:



NanoDrop™ — зарегистрированная торговая марка Thermo Fisher Scientific.

Ver. KUNPZ
#5555C

22.09.509-QM
Issued by INSPECT

www.lumiprobe.com