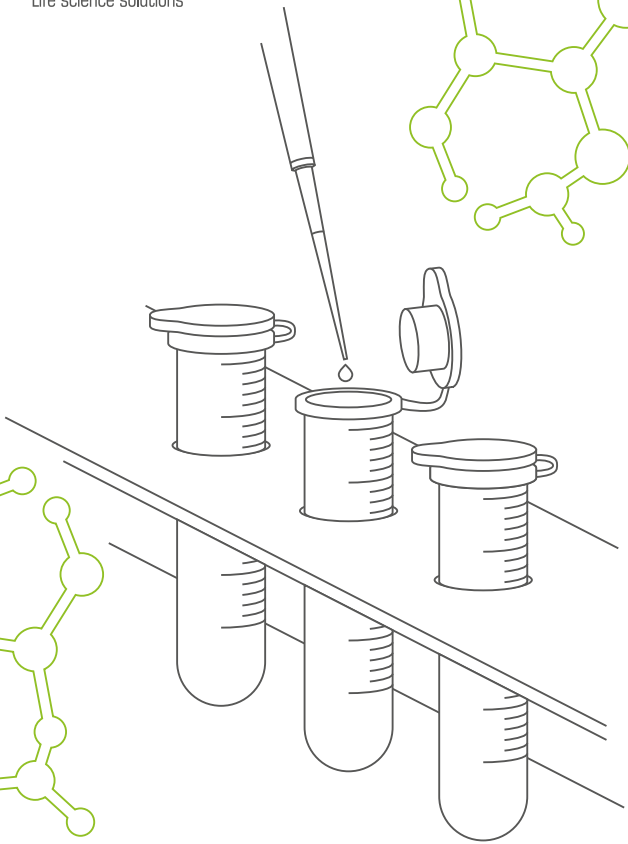
Lumiprobe
Life science solutions



Инструкция к набору Ribo488 RNA Plate Reader Assay

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору Ribo488 RNA Plate Reader Assay ... 3-11

RU

Инструкция к набору Ribo488 RNA Plate Reader Assay

Краситель Ribo488 — высокочувствительный и селективный реагент, связывающийся с РНК с образованием флуоресцирующего комплекса и позволяющий определять концентрацию РНК в растворе с использованием флуориметра. Краситель может использоваться, например, для измерения концентрации РНК после транскрипции *in vitro*, перед Нозерн-гибридизацией, в анализе с использованием нуклеазы S1, в приготовлении кДНК-библиотек, перед постановкой обратной транскрипции и др.

Набор Ribo488 RNA Plate Reader Assay для определения количества РНК на планшетном ридере позволяет количественно измерять концентрацию РНК в широком диапазоне — от 1 нг/мл до 1000 нг/мл. Это достигается использованием реагента Ribo488 в двух разведениях, рассчитанных для **высокого** (20 нг/мл – 1000 нг/мл) и **низкого** (1 нг/мл – 50 нг/мл) содержания РНК в образцах. Селективность связывания Ribo488 с РНК позволяет сохранять линейную зависимость в присутствии многих примесей, таких как нуклеотиды, соли, мочевина, этанол, хлороформ, детергенты, белки и агароза. Хотя Ribo488 связывается и с ДНК, предварительная обработка образцов ДНКазой позволяет измерять концентрацию только РНК.

Данный набор совместим со стандарными планшетным и кюветным флуориметрами, а также NanoDrop™ 3300 и другими распространенными ридерами для пробирок 0,5 мл версий 3.0 и 4.0.

Состав набора

Компонент набора	Количество	
	11520 200 assays	21520 2000 assays
11510, Краситель Ribo488 для определения концентрации РНК, 100 uL	1	—
A0650, Стандарт РНК, 100 нг/мкл в TE буфере, 100 uL	1	—
41510, Краситель Ribo488 для определения концентрации РНК, 1 mL	—	1
B0650, Стандарт РНК, 100 нг/мкл в TE буфере, 1 mL	—	1
N9150, Буфер TE (без РНКаз), 20×, 25 mL	1	1

Транспортировка: до одной недели при комнатной температуре. Хранить при температуре от +2°C до +8°C. Не замораживать!

Срок хранения 12 месяцев.

Необходимые материалы:

- Дозаторы и наконечники для дозаторов, не содержащие нуклеаз (рекомендуется использовать наконечники с фильтром);
- Пластиковые пробирки на 15 и 50 мл, эппендорфы на 1,5 мл, не содержащие нуклеаз;
- Вода без нуклеаз (например, обработанная диэтилпирокарбонатом, (ДЭПК);
- Микропланшеты для измерения флуоресценции на планшетном флуориметре или кюветы для измерения на кюветном флуориметре.

Протокол

! Чтобы нивелировать возможные ошибки дозирования, мы рекомендуем приготовить 1× TE буфер и рабочий раствор красителя Ribo488 с запасом 10–25%.

! Уровень флуоресценции комплекса РНК/краситель сильно зависит от температуры, поэтому перед экспериментом все реагенты должны быть одинаковой комнатной температуры, оптимально 22–25°C.

! Данный протокол разработан для измерения РНК на планшетном флуориметре, но может быть также применим к ридерам для пробирок 0,5 мл версий 3.0 и 4.0 в режиме флуориметра. В случае использования кюветного флуориметра приведенные в данном протоколе объёмы следует пропорционально увеличить в зависимости от объёма кюветы.

1. Приготовление 1× TE буфера

Для приготовления необходимого количества 1× TE буфера, разведите 20× концентрат TE буфера в 20 раз деионизированной водой, обработанной ДЭПК. Для расчета необходимого объёма 1× TE буфера воспользуйтесь таблицей рекомендуемых объёмов и следующей формулой:

$V_{буфера} = V_{образца} \times (N_{образцов} + 5) \times 4$;

где $V_{буфера}$ — искомый объём 1× TE буфера, мл; $V_{образца}$ — общий объём образца, мл; $N_{образцов}$ — количество экспериментальных растворов РНК, и 5 — количество стандартных растворов.

Например, по таблице ниже, общий объём образца ($V_{образца}$) для планшетного флуориметра равен 0,2 мл. Соответственно, для измерения концентрации РНК в 10 экспериментальных растворах необходимо приготовить 12 мл 1× TE буфера.

Рекомендуемые объёмы для измерения концентрации РНК с помощью красителя Ribo488:

Тип оборудования		Объём рабочего раствора красителя Ribo488	Объём стандартного раствора РНК / исследуемого образца	Общий объём образца ($V_{образца}$)*
Планшетный флуориметр	96-луночный планшет*, на лунку	0,1 мл	0,1 мл	0,2 мл
	24-луночный планшет, на лунку	0,5 мл	0,5 мл	1 мл
	Другие планшеты	37,5% объёма лунки	37,5% объёма лунки	около 75% объёма лунки
Кюветный флуориметр	Стандартная флуориметрическая кювета (3.5 мл)	1 мл	1 мл	2 мл
	Другие флуориметрические кюветы	37,5% от объёма кюветы	37,5% от объёма кюветы	около 75% от объёма кюветы
NanoDrop™ 3300*		0,05 мл	0,05 мл	0,1 мл

**Общий объем образца складывается из раствора красителя и стандартного/экспериментального раствора РНК, смешанных в равных объёмах.*

2. Приготовление рабочего раствора красителя Ribo488

2.1. Разморозьте и тщательно перемешайте содержимое пробирки с красителем. Сбросьте капли с крышки центрифугированием.

2.2. Рассчитайте объём рабочего раствора красителя по следующей формуле:

$V_{ribo} = ½ \times V_{буфера}$;

где V_{ribo} — искомый объём рабочего раствора красителя Ribo488, мл; $V_{буфера}$ — объём 1x TE-буфера, рассчитанный в п.1 текущего протокола, мл.

Например, для измерения на планшетном флуориметре 10 экспериментальных растворов РНК потребуется 6 мл рабочего раствора красителя.

2.3. Перенесите 1x TE объёмом равным V_{ribo} в новую пластиковую пробирку и добавьте концентрат красителя.

- Для измерения РНК в диапазоне **высоких** концентраций (от 20 нг/мл до 1000 нг/мл) разведите концентрат красителя Ribo488 в **200** раз 1× TE буфером.
- Для измерения РНК в диапазоне **низких** концентраций (1 нг/мл – 50 нг/мл) разведите концентрат красителя Ribo488 в **2000** раз приготовленным 1× TE буфером.

Например, если 10 экспериментальных растворов предположительно имеют высокую концентрацию РНК, то к 6 мл 1x TE буфера необходимо добавить 30 мкл концентрата Ribo488, а если низкую, то 3 мкл концентрата красителя.

! Готовый рабочий раствор красителя пригоден для использования в течение 3 ч.

*! 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, приведет к искажению результатов измерений.*

3. Приготовление стандартных растворов РНК

- **Для работы в области высоких концентраций РНК** (от 20 нг/мл до 1000 нг/мл) приготовьте стоковый раствор РНК с концентрацией 2000 нг/мл. Для этого внесите в пробирку 30 мкл стандарта РНК из набора и 1,47 мл 1× ТЕ буфера.

  Далее, из этого стокового раствора приготовьте в планшете стандартные растворы РНК следующих концентраций: 1000 нг/мл, 500 нг/мл, 100 нг/мл, 20 нг/мл и 0 нг/мл. Для этого последовательно внесите в лунки планшета 1x ТЕ буфер и стоковый раствор РНК 2000 нг/мл в количестве, указанном в таблице ниже.

  Важно: *рабочий раствор красителя (приготовлен путем разбавления концентрата в 200 раз в п. 2) будет добавлен в п. 5 настоящего протокола.*

  Приготовление стандартов РНК для построения калибровочной прямой в диапазоне от 20 нг/мл до 1000 нг/мл (**высокие концентрации**):

Объём 1× ТЕ буфера, вносимого в лунку планшета, мкл	Объём стокового раствора РНК 2000 нг/мл, вносимого в лунку планшета, мкл	Объём рабочего раствора красителя Ribo488, вносимого в лунку планшета, мкл	Концентрация РНК в стандартном растворе, нг/мл
0	100	100	1000
50	50	100	500
90	10	100	100
98	2	100	20
100	0	100	0

- **Для работы в области низких концентраций РНК** (1 нг/мл – 50 нг/мл) приготовьте стоковый раствор РНК с концентрацией 100 нг/мл. Для этого сначала внесите в пробирку 30 мкл стандарта РНК из набора и 1,47 мл 1× ТЕ буфера, тщательно перемешайте. Далее, перенесите 75 мкл приготовленного раствора РНК в новую пробирку и добавьте 1,425 мл 1× ТЕ буфера.

  Используя этот раствор, приготовьте в планшете стандартные растворы РНК следующих концентраций: 50 нг/мл, 25 нг/мл, 5 нг/мл, 1 нг/мл и 0 нг/мл. Для этого последовательно внесите в лунки планшета 1x ТЕ буфер и стоковый раствор РНК 100 нг/мл в количестве, указанном в таблице ниже.

Важно: *рабочий раствор красителя (приготовлен путем разбавления концентрата в 2000 раз в п. 2) будет добавлен позже, в п. 5 настоящего протокола.*

Приготовление стандартов РНК для построения калибровочной прямой в диапазоне от 1 нг/мл – 50 нг/мл (**низкие концентрации**):

Объём 1× ТЕ буфера, вносимого в лунку планшета, мкл	Объём стокового раствора РНК 100 нг/мл, вносимого в лунку планшета, мкл	Объём рабочего раствора красителя Ribo488, вносимого в лунку планшета, мкл	Концентрация РНК в стандартном растворе, нг/мл
0	100	100	50
50	50	100	25
90	10	100	5
98	2	100	1
100	0	100	0

4. Приготовление экспериментальных образцов

4.1. Разведите исследуемые образцы РНК в 1× TE буфере таким образом, чтобы конечный объём для каждого образца составлял 100 мкл, перенесите в лунки планшета.

4.2. Добавьте к стандартным растворам РНК и экспериментальным образцам по 100 мкл рабочего раствора красителя Ribo488. Перемешайте все растворы пипетированием.

4.3. Инкубируйте приготовленные стандартные образцы РНК и экспериментальные образцы 5 минут при комнатной температуре.

5. Измерение интенсивности флуоресценции стандартных растворов РНК и экспериментальных образцов

Так как комплекс красителя Ribo488 с РНК имеет максимум поглощения при длине волны 493 нм и максимум испускания при 525 нм, то рекомендуемая к установке длина волны возбуждения соответствует 480 нм, а флуоресценции — 520 нм.

Чтобы гарантировать, что показания флуоресценции остаются в диапазоне обнаружения, чувствительность флуориметра рекомендуется настраивать чуствительность флуориметра на стандарте с максимальной концентрацией РНК (50 нг/мл или 1000 нг/мл). Его уровень флуоресценции должен быть близок к максимуму RFU прибора. При работе с РНК в **низком** диапазоне концентраций для оптимальной чувствительности, настройки усиления прибора следует увеличить.

6. Расчёт концентрации РНК

6.1. Вычтите значение флуоресценции для стандартов без РНК из значения флуоресценции образцов, содержащих РНК. Используйте эти данные для построения калибровочной кривой

6.2. Постройте калибровочную кривую, используя данные об уровне флуоресценции стандартных растворов в координатах: по оси абсцисс (x) — конечная

концентрация РНК в стандартном растворе; по оси ординат (y) — значение флуоресценции.

6.3. Аппроксимируйте данные линейной функцией, найдите параметры функции A и B. Для этого можно воспользоваться калькулятором для расчета концентрации РНК.

6.4. 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 РНК, A и B — параметры линейной функции.

6.5. Определение концентрации РНК в экспериментальном образце:

$C_{образца} = (FL_{образца} - B)/A$;

где $FL_{образца}$ — флуоресценция образца, A и B — параметры найденной линейной функции.

6.6. Концентрация РНК в исходном образце:

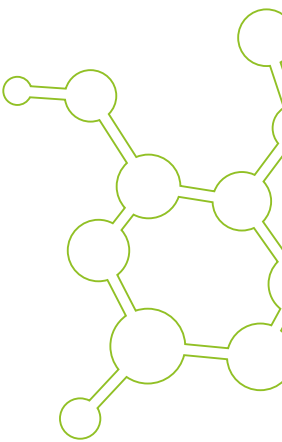
$C_{исх} = V_{образца} \times C_{образца} / V_{исх}$;

где $V_{образца}$ — объём образца и $V_{исх}$ — объём исходного раствора РНК, использованный для приготовления экспериментального образца.

NanoDrop™ — зарегистрированная торговая марка Thermo Fisher Scientific.

Ver. N7PFQ
#11510

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com