

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

Инструкция к набору Ribo488 RNA Plate Reader Assay

Краситель Ribo488 — высокочувствительный 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 *к*ДНК-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. Линейная зависимость сохраняется 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 стандартными 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 50-500 assays	21520 200-2000 assays
21510, Краситель Ribo488 для определения концентрации РНК, 250 μ L	1	—
41510, Краситель Ribo488 для определения концентрации РНК, 1 mL	—	1
B0650, Стандарт РНК, 100 нг/мкл в ТЕ буфере, 1 mL	1	1
N2150, Буфер TE, 20x, 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, эпендорфы 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× ТЕ 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× ТЕ буфера

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

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

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

Например, по таблице ниже, общий объем образца ($V_{\text{образца}}$) для планшетного флуориметра равен 0,2 мл. Соответственно, для измерения концентрации РНК в 10 экспериментальных растворах необходимо приготовить 12 мл 1× ТЕ 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
	24-луночный планшет, на лунку	0,5 мл	0,5 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
	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 объемах.

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:

$$V_{\text{рабо}} = \frac{1}{2} \times V_{\text{буфера}},$$

где $V_{\text{рабо}}$ — искомый объём рабочего раствора красителя Ribo488, мл; $V_{\text{буфера}}$ — 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 $V_{\text{рабо}}$ 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 1x TE буфером.
- Для измерения РНК в диапазоне **низких** концентраций (1 нг/мл – 50 нг/мл) разведите концентрат красителя Ribo488 в **2000** раз приготовленным 1x 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× TE 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 1× TE 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× TE 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× TE буфера, тщательно перемешайте. Далее, перенесите 75 мкл приготовленного раствора РНК в новую пробирку и добавьте 1,425 мл 1× TE 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 TE 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× TE буфера, вносимого в лунку планшета, мкл	Объём стокового раствора РНК 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 $1 \times$ ТЕ 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 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:

$$C_{\text{образца}} = (FL_{\text{образца}} - B)/A;$$

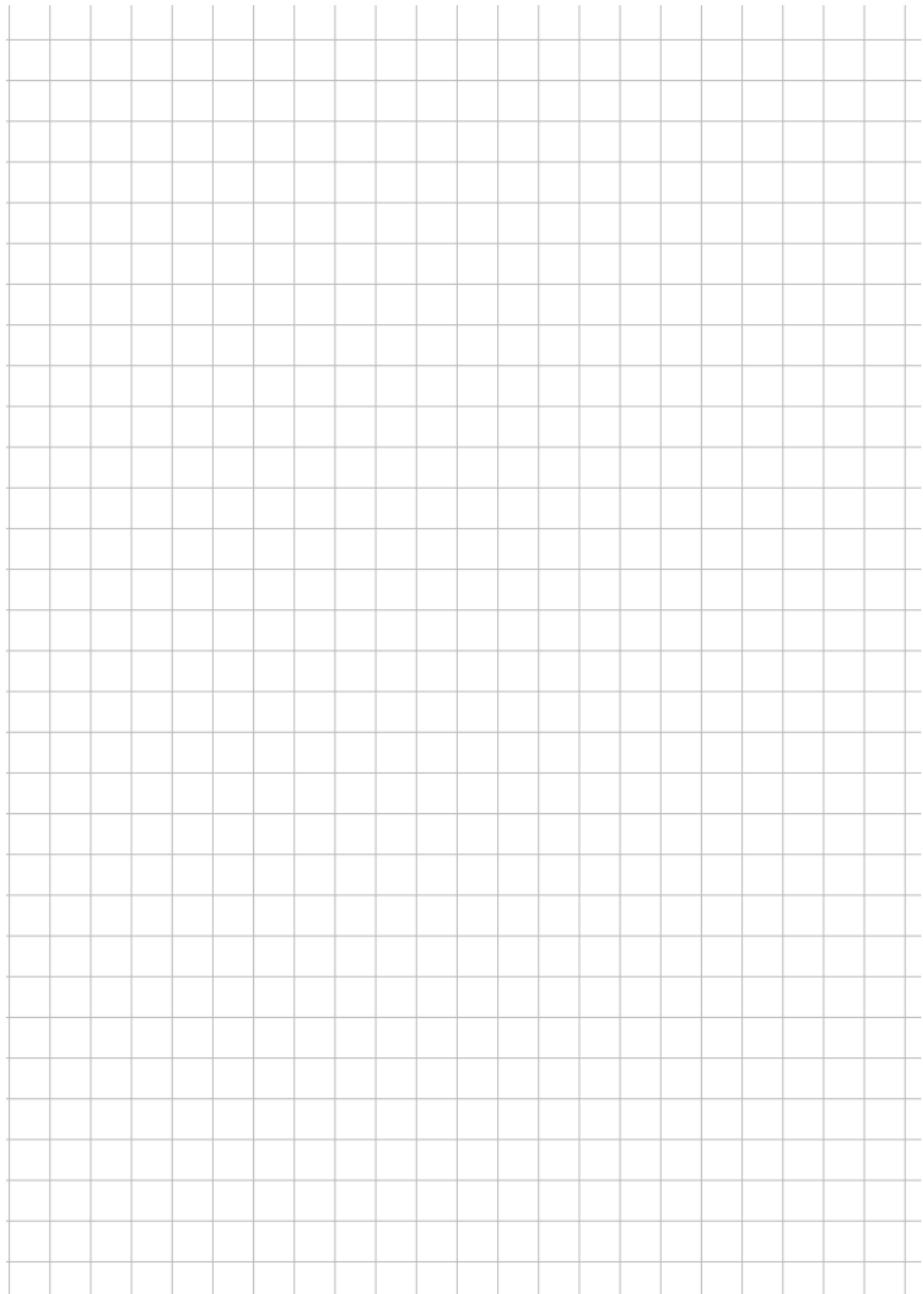
где $FL_{\text{образца}}$ — флуоресценция образца, A и B — параметры найденной линейной функции.

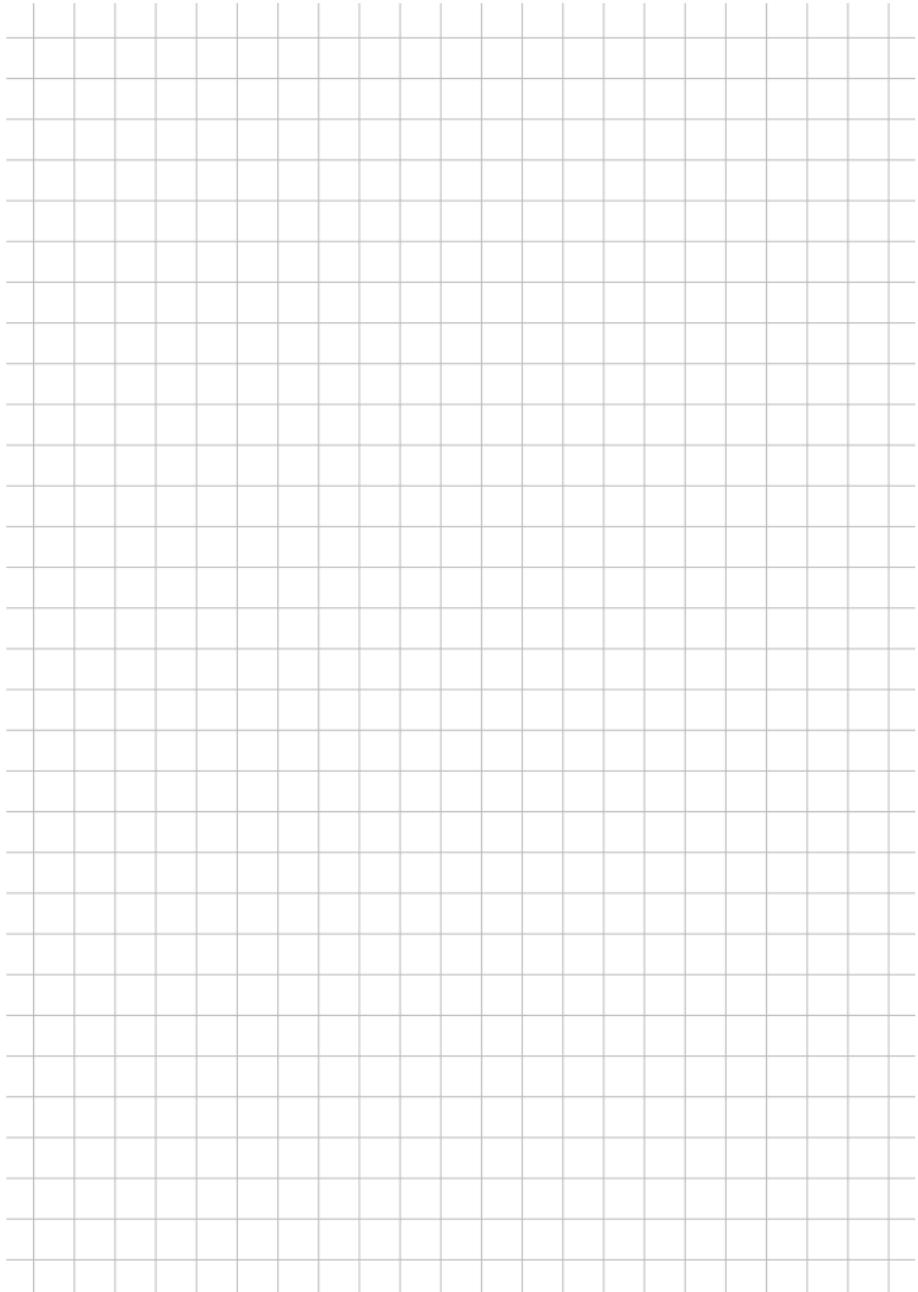
6.6. Концентрация РНК в исходном образце:

$$C_{\text{исх}} = V_{\text{образца}} \times C_{\text{образца}} / V_{\text{исх}},$$

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

NanoDrop™ — зарегистрированная торговая марка Thermo Fisher Scientific.





Ver. PL1JW
#11510



22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

