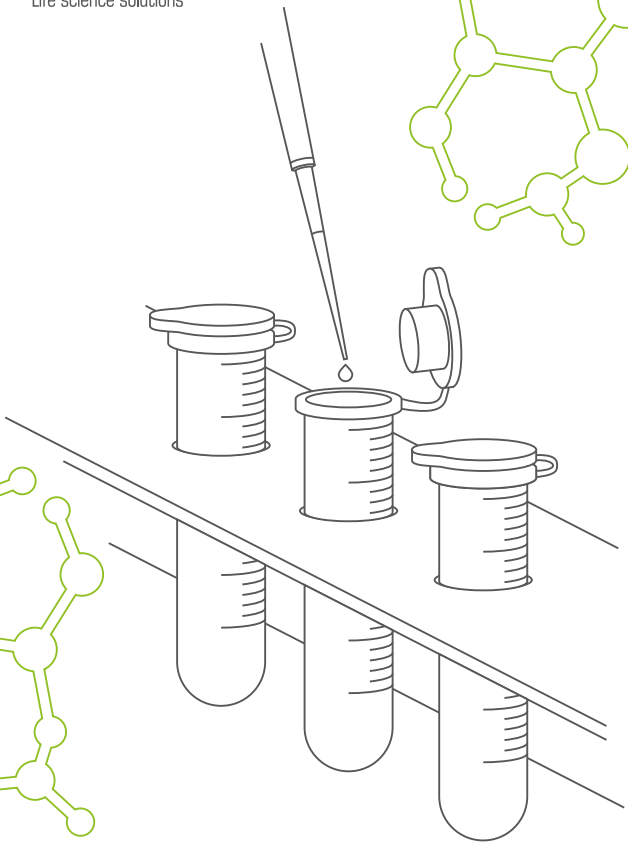
Lumiprobe
Life science solutions



Инструкция к набору Ribo488 RNA BR Fluorimetric Assay для определения количества РНК

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Русский: Инструкция к набору Ribo488 RNA BR Fluorimetric Assay для определения количества РНК 3-9

RU

Инструкция к набору Ribo488 RNA BR Fluorimetric Assay для определения количества РНК

Набор предназначен для измерения концентрации РНК в широком диапазоне на флуориметре (подходит любая версия флуориметра, например, QuReader 1 или QuReader 8).

Набор позволяет точно измерять концентрацию РНК в диапазоне от 100 пг/мкл до 1000 нг/мкл для исходного образца (диапазон количества РНК для измерения на флуориметре: 2–1000 нг РНК в 200 мкл образца для измерения).

Основной компонент набора — флуоресцентный краситель Ribo488, селективно связывающий РНК и проявляющий выраженную флуоресценцию в составе комплекса с молекулой РНК. Благодаря селективности, результаты измерения, полученные с использованием Ribo488, не зависят от примесей ДНК, одноцепочечной ДНК, нуклеотидов и белков. Другие примеси в незначительном количестве, такие как соли, детергенты и растворители, оказывают лишь несущественное влияние на результаты измерений.

Использование набора Ribo488 RNA BR Fluorimetric Assay является удобным способом измерения РНК в широком диапазоне концентраций:

- он требует небольшого объема исходного образца (1–20 мкл);
- все измерения проводятся при комнатной температуре;
- в зависимости от количества образцов измерения занимают в среднем 15–20 минут;
- флуоресценция образцов стабильна в течение 3 часов.

Набор включает в себя 200× концентрат флуоресцентного красителя Ribo488, буфер для приготовления рабочего раствора красителя и стандарты концентрации РНК (0 и 100 нг/мкл). Для удобства мы предлагаем фасовки набора, включающие совместимые с флуориметром тонкостенные пробирки.

Для определения в образце РНК примеси белка можно использовать набор QuDye® Protein для определения количества белка.

Состав набора

Компонент набора	Количество				
	S2502 40 assays	12502 100 assays	14502 100 assays	52502 500 assays	54502 500 assays
11510, Краситель Ribo488 для определения концентрации РНК, 100 uL	1	—	—	—	—
N2150, Буфер TE, 20x, 25 mL	—	—	—	1	—
G2150, Буфер TE, 20x, 5 mL	1	1	—	—	—
A0650, Стандарт РНК, 100 нг/мкл в TE буфере, 100 uL	1	1	1	—	—
B9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в TE буфере, 1 mL	1	1	1	—	—
21510, Краситель Ribo488 для определения концентрации РНК, 250 uL	—	1	1	—	—
S3250, Буфер TE, 1x, 50 mL	—	—	1	—	5
51510, Краситель Ribo488 для определения концентрации РНК, 1.25 mL	—	—	—	1	1
B0650, Стандарт РНК, 100 нг/мкл в TE буфере, 1 mL	—	—	—	1	1
G9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в TE буфере, 5 mL	—	—	—	1	1

Хранить при температуре +4°C. Прогреть до комнатной температуры перед использованием. Транспортировка: до трех недель при комнатной температуре.

Срок хранения 12 месяцев.

Прежде чем начать

- Все измерения с использованием набора Ribo488 RNA BR Fluorimetric Assay green должны проводиться при комнатной температуре (22–28°C).
- Перед началом работы тщательно прогрейте все используемые растворы до комнатной температуры.
- При регулярном использовании набора рекомендуется хранить краситель Ribo488 RNA Quantification Reagent и 1× буфер TE Buffer при комнатной температуре в защищенном от света месте, 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.
- Измерение интенсивности флуоресценции следует выполнять согласно инструкции к флуориметру. В зависимости от версии флуориметра пункты меню могут отличаться от приведённых ниже.
- Данным набором можно пользоваться в режиме флуориметра в зеленом канале на приборах серии QuReader и других моделях с длиной волны возбуждения 430—495 нм и длиной волны эмиссии в зеленом канале 510—580 нм.
- Также измерение концентраций РНК можно выполнять в режиме dsDNA Broad Range на флуориметрах серии QuReader и аналогичных приборах.

Измерение концентрации РНК в режиме флуориметра

1. Подготовьте 8 пробирок на 1,5 мл, подпишите их. Приготовьте панель разведений 100 нг/мкл РНК методом титрования по схеме:
    1. 100 нг/мкл (200 мкл стандарта)
    2. 50 нг/мкл (100 мкл 1× TE-buffer и 100 мкл стандарта 100 нг/мкл)
    3. 25 нг/мкл (100 мкл 1× TE-buffer и 100 мкл стандарта 50 нг/мкл)
    4. 12,5 нг/мкл (100 мкл 1× TE-buffer и 100 мкл стандарта 25 нг/мкл)
    5. 6,25 нг/мкл (100 мкл 1× TE-buffer и 100 мкл стандарта 12,5 нг/мкл)
    6. 3,12 нг/мкл (100 мкл 1× TE-buffer и 100 мкл стандарта 6,25 нг/мкл)
    7. 1,56 нг/мкл (100 мкл 1× TE-buffer и 100 мкл стандарта 3,12 нг/мкл)
    8. 0 нг/мкл (100 мкл 1× TE-buffer)
2. Приготовьте рабочий раствор красителя. Для этого в пробирке на 2 мл смешайте 10 мкл красителя и 1990 мкл 1× TE buffer.
3. Подготовьте 8 пробирок на 0,5 мл, добавьте в них стандарты по 10 мкл и по 190 мкл рабочего раствора красителя. Пробирки вортексируйте, сбросьте капли и инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре.
4. Проведите измерения флуоресценции.

Расчёт концентрации РНК

1. 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.
2. Аппроксимируйте данные линейной функцией, найдите параметры функции A и B. Для этого можно воспользоваться калькулятором для расчета концентрации РНК.
3. 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.
4. Вычислите концентрации РНК в экспериментальном образце:

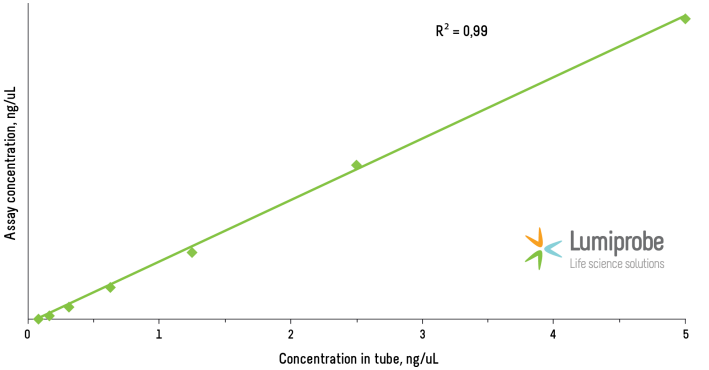
   $C_{образца} = (FL_{образца} - B)/A$;

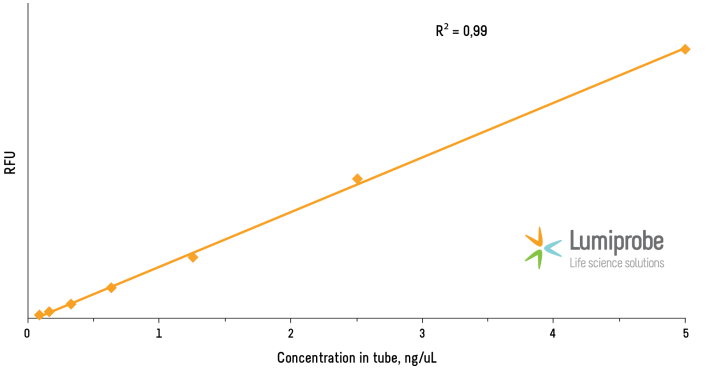
   где $FL_{образца}$ — флуоресценция образца, A и B — параметры найденной линейной функции.
5. Вычислите концентрации РНК в исходном образце:

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

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

Ниже представлены графики зависимости RFU от теоретической концентрации РНК в образцах разведения и зависимости рассчитанной концентрации (Assay concentration) от теоретической концентрации РНК в образцах на приборе QuReader в режиме измерения флуоресценции:





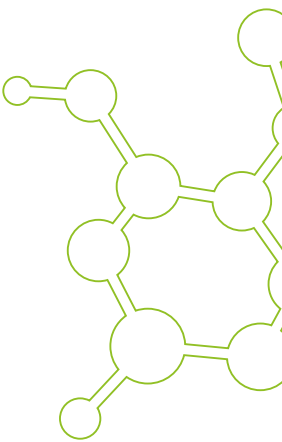
Внимание! Набор **Ribo488 RNA BR Fluorimetric Assay** адаптирован для измерения концентраций РНК на флуориметрах в режиме dsDNA Broad Range в зеленом канале. Измерения можно проводить по протоколу, описанному в инструкции для набора QuDye® dsDNA BR для определения количества двухцепочечной ДНК.
В этом случае достаточно калибровки по двум точкам и расчёт концентрации РНК с помощью софта флуориметра.

Условия хранения

- Хранить при температуре 4°C. Прогреть до комнатной температуры перед использованием.
- Транспортировка: до одной недели при комнатной температуре.
- Срок хранения в месяцах: 12

Ver. NFX5F

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com