

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

Contents

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

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 1 до 1200 нг/мкл для исходного образца (количество РНК для измерения на флуориметре: 20–1200 нг РНК в 200 мкл образца).

Основной компонент набора — флуоресцентный краситель **Ribo488**, связывающий РНК и проявляющий выраженную флуоресценцию в составе комплекса с молекулой РНК. 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 | 12502 | 14502 | 52502 | 54502 |
| | 40 | 100 | 100 | 500 | 500 |
| | assays | assays | assays | assays | assays |
| 11510, Краситель Ribo488 для определения концентрации РНК, 100 μ L | 1 | — | — | — | — |
| N2150, Буфер TE, 20x, 25 mL | — | — | — | 1 | — |
| G2150, Буфер TE, 20x, 5 mL | 1 | 1 | — | — | — |
| B0650, Стандарт РНК, 100 нг/мкл в TE буфере, 1 mL | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 |
| B9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в TE буфере, 1 mL | 1 | 1 | 1 | — | — |
| 21510, Краситель Ribo488 для определения концентрации РНК, 250 μ L | — | 1 | 1 | — | — |
| S3250, Буфер TE, 1x, 50 mL | — | — | 1 | — | 5 |
| 51510, Краситель Ribo488 для определения концентрации РНК, 1.25 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 одной недели при комнатной температуре.

Срок хранения 12 месяцев.

Прежде чем начать

- Для измерения рекомендуется использовать образец РНК, очищенный от примесей днК и оцнК.
- Все измерения с использованием набора Ribo488 RNA BR Fluorimetric Assay 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.
- Набор позволяет производить измерения в зеленом канале в режиме флуориметра на приборах серии QuReader и других моделях с длиной волны возбуждения 430–495 нм и длиной волны эмиссии 510–580 нм.

Измерение концентрации РНК в режиме флуориметра

1. Подготовьте 8 пробирок на 1,5 мл, подпишите их. Приготовьте панель разведений РНК-стандарта 100 нг/мкл методом титрования по схеме:
 - **100 нг/мкл** (100 мкл стандарта)
 - **50 нг/мкл** (50 мкл стандарта 0 нг/мкл и 50 мкл стандарта 100 нг/мкл)
 - **25 нг/мкл** (50 мкл стандарта 0 нг/мкл и 50 мкл стандарта 50 нг/мкл)
 - **12,5 нг/мкл** (50 мкл стандарта 0 нг/мкл и 50 мкл стандарта 25 нг/мкл)
 - **6,25 нг/мкл** (50 мкл стандарта 0 нг/мкл и 50 мкл стандарта 12,5 нг/мкл)
 - **3,12 нг/мкл** (50 мкл стандарта 0 нг/мкл и 50 мкл стандарта 6,25 нг/мкл)
 - **1,56 нг/мкл** (50 мкл стандарта 0 нг/мкл и 50 мкл стандарта 3,12 нг/мкл)
 - **0 нг/мкл** (100 мкл стандарта)
2. Приготовленные стандарты хранить не более суток при температуре 4°C.
3. Приготовьте рабочий раствор красителя из расчета, что на каждый экспериментальный образец и на каждый из восьми стандартных растворов РНК потребуется около 200 мкл. Для этого разведите 200× концентрат красителя Ribo488 в 200 раз 1× ТЕ буфером. Например, для измерения 8 стандартных растворов РНК и 2 образцов необходимо приготовить 200 мкл $10 = 2000$ мкл рабочего раствора красителя (смешайте 10 мкл 200× концентрат красителя Ribo488 и 1990 мкл буфера 1× ТЕ буфера).
4. Подготовьте 8 пробирок объемом 0,5 мл для стандартных растворов РНК и по одной пробирке для каждого измеряемого экспериментального образца. Подпишите крышки пробирок (не делайте пометок на стенках пробирок, так как это может привести к некорректному определению интенсивности флуоресценции).
5. В каждую пробирку для стандартов внесите рабочий раствор красителя и стандартные растворы РНК, полученные в пункте 1, в соответствии с приведенной ниже таблицей:

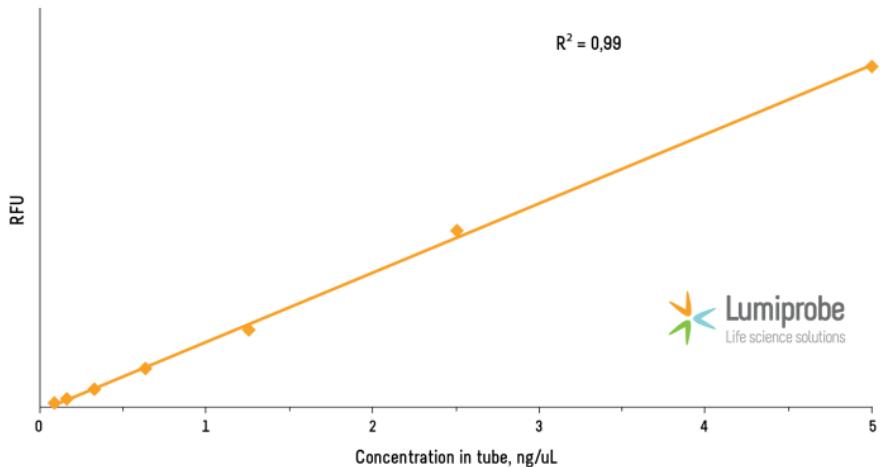
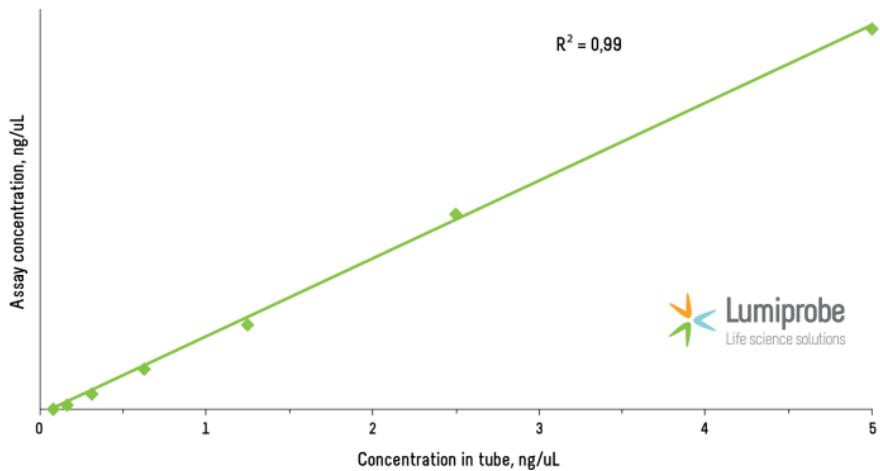
| Объем рабочего раствора красителя, мкл | Объем стандартного раствора РНК, мкл | Исходная концентрация стандартного раствора РНК | Конечная концентрация РНК в измеряемом стандартном растворе |
|--|--------------------------------------|---|---|
| 190 | 10 | 100 нг/мкл | 5 нг/мкл |
| 190 | 10 | 50 нг/мкл | 2,5 нг/мкл |
| 190 | 10 | 25 нг/мкл | 1,25 нг/мкл |
| 190 | 10 | 12,5 нг/мкл | 0,625 нг/мкл |
| 190 | 10 | 6,25 нг/мкл | 0,3125 нг/мкл |
| 190 | 10 | 3,12 нг/мкл | 0,156 нг/мкл |
| 190 | 10 | 1,56 нг/мкл | 0,078 нг/мкл |
| 190 | 10 | 0 нг/мкл | 0 нг/мкл |

13. В каждую пробирку для образцов внесите 180–199 мкл рабочего раствора красителя Ribo488 и 20–1 мкл образца соответственно (конечный объём в каждой пробирке должен составить 200 мкл).
14. Перемешайте все пробирки (содержащие стандарты и исследуемые образцы) на вортексе, сбросьте капли и инкубируйте в течение 5 мин при комнатной температуре.
15. 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 измеряемом стандартном растворе (конечные концентрации стандартных растворов обозначены в последнем столбце вышеуказанной таблицы); 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:
$$C_{\text{образца}} = (FL_{\text{образца}} - B)/A;$$
где $FL_{\text{образца}}$ — флуоресценция образца, A и B — параметры найденной линейной функции.
5. Вычислите концентрации 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.

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:





22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

