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 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 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	—	—	—
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 uL	—	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 дцДНК и оцДНК.
- 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)

   Приготовленные стандарты хранить не более суток при температуре 4°C.
2. 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× TE буфером. Например, для измерения 8 стандартных растворов РНК и 2 образцов необходимо приготовить 200 мкл x 10 = 2000 мкл рабочего раствора красителя (смешайте 10 мкл 200× концентрата красителя Ribo488 и 1990 мкл буфера 1× TE буфера).
3. 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).
4. 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**

5. 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).
6. Перемешайте все пробирки (содержащие стандарты и исследуемые образцы) на вортексе, сбросьте капли и инкубируйте в течение 5 мин при комнатной температуре.
7. 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:

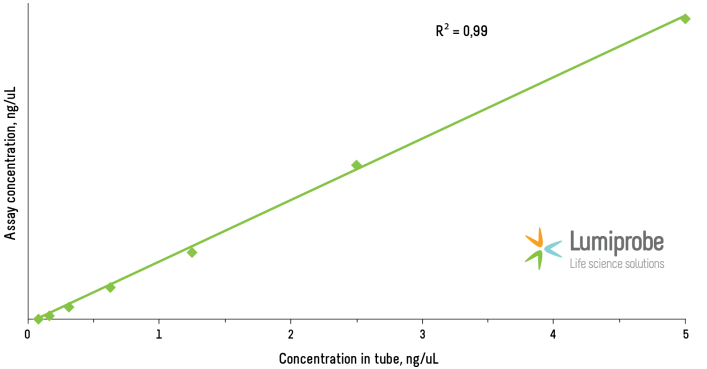
   $C_{образца} = (FL_{образца} - B)/A$;

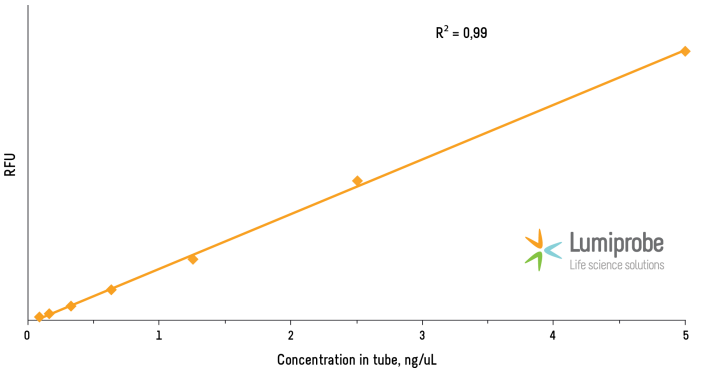
   где $FL_{образца}$ — флуоресценция образца, A и B — параметры найденной линейной функции.
5. Вычислите концентрации РНК в исходном образце:

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

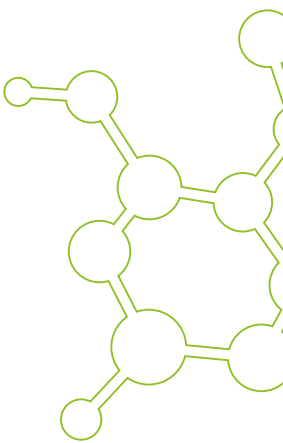
   где $V_{образца}$ — объём образца и $V_{исх}$ — объём исходного раствора РНК, использованный для приготовления экспериментального образца.

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:


R² = 0,99
Assay concentration, ng/uL
Concentration in tube, ng/uL
0
1
2
3
4
5
Lumiprobe
Life science solutions


R² = 0,99
RFU
Concentration in tube, ng/uL
0
1
2
3
4
5
Lumiprobe
Life science solutions

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com