

Определение концентрации двухцепочечной ДНК с помощью красителя PreciseGreen

[Краситель PreciseGreen для определения концентрации ДНК](#) представляет собой высокочувствительный реагент для определения низких концентраций двухцепочечной ДНК (не определяемых спектрофотометрическим методом при длине волны 260 нм). Благодаря селективному связыванию красителя с двухцепочечной ДНК на результаты измерения не оказывают влияния одноцепочечная ДНК, РНК, нуклеотиды, белки и другие присутствующие в пробе примеси.

Линейный диапазон измерения концентрации ДНК с помощью красителя PreciseGreen составляет от 1 пг/мкл до 5 нг/мкл. Краситель, связанный с молекулой двухцепочечной ДНК, имеет максимум поглощения при длине волны 503 нм и максимум испускания при 525 нм (для проведения измерений подойдет любой тип флуориметра). Для большей точности и воспроизводимости данных рекомендуется разводить образцы ДНК и краситель PreciseGreen в ТЕ буфере (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA). Для расчёта концентрации исследуемой ДНК необходимо построить калибровочную кривую, используя серию разведений стандартного раствора ДНК.

Буфер, стандартный раствор ДНК и краситель PreciseGreen входят в состав [набора PreciseGreen для определения количества дцДНК](#). Краситель PreciseGreen также доступен для заказа отдельно. Раствора красителя объемом 1 мл достаточно для проведения 200 измерений при работе с объемом измеряемого образца 2 мл (минимально необходимый объем образца для измерений в стандартной флуориметрической кювете объемом 3.5 мл). Количество измерений может варьироваться в зависимости от объема образца. Рекомендуемые объемы образца для наиболее популярного флуориметрического оборудования представлены ниже в таблице.

Протокол

1. Приготовление рабочего раствора PreciseGreen

Разморозьте и тщательно перемешайте содержимое пробирки с красителем. Приготовьте достаточное количество рабочего раствора красителя для всех образцов (исследуемые образцы и стандартные растворы ДНК): объем рабочего раствора красителя должен составить 50% от общего объема измеряемого образца (уточните в таблице ниже рекомендуемый объем образца для используемого оборудования). Разведите необходимое количество красителя PreciseGreen в 200 раз буфером (мы рекомендуем использовать ТЕ буфер: 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5). Перемешайте. Раствор пригоден для использования в течение 3 часов.

! Чтобы нивелировать возможные ошибки дозирования, мы рекомендуем приготовить рабочий раствор красителя с запасом 10-25%. Для расчета необходимого объема рабочего раствора красителя Вы можете воспользоваться следующей формулой:

$$V_{\text{PreciseGreen}} = 5/8 \times V_{\text{образца}} \times (N_{\text{образцов}} + N_{\text{стандартов}})$$
, где $V_{\text{образца}}$ — измеряемый объем исследуемого образца или стандарта, $N_{\text{образцов}}$ — количество измеряемых образцов, и $N_{\text{стандартов}}$ — количество измеряемых стандартов (включая образец с нулевой концентрацией ДНК).

2. Приготовление образцов

Разведите исследуемый образец ДНК в буфере таким образом, чтобы объём образца составил 50% измеряемого объёма (исходный объём образца может быть любым, однако конечное разведение должно соответствовать диапазону 1 пг/мкл — 5 нг/мкл). Добавьте равный объём рабочего раствора красителя PreciseGreen. Перемешайте и инкубируйте 5 минут.

Аналогичным образом приготовьте разведения стандартного раствора ДНК. Обратите внимание, что разведения стандартного раствора ДНК должны находиться в диапазоне концентраций экспериментальных образцов и быть приготовлены таким образом, чтобы соответствовать линейному диапазону измерений вашего оборудования. Готовый стандартный раствор ДНК доступен только в составе набора. При заказе красителя PreciseGreen отдельно (не в составе набора), поставка стандартного раствора ДНК не предусмотрена.

Рекомендуемые объёмы для измерения концентрации ДНК с помощью красителя PreciseGreen:

Тип оборудования		Общий объём образца (V _{образца})	Объём рабочего раствора красителя PreciseGreen	Объём экспериментального раствора ДНК
Кюветный флуориметр	Стандартная флуориметрическая кювета (3.5 мл)	2 мл	1 мл	1 мл
	Другие флуориметрические кюветы	около 75% объёма кюветы	37.5% объёма кюветы	37.5% объёма кюветы
Планшетный флуориметр	96-луночный планшет*, на лунку	0.2 мл	0.1 мл	0.1 мл
	24-луночный планшет, на лунку	1 мл	0.5 мл	0.5 мл
	Другие планшеты	около 75% объёма лунки	37.5% объёма лунки	37.5% объёма лунки
NanoDrop™ 3300*		0.1 мл	0.05 мл	0.05 мл

* Для обеспечения точности измерений рекомендуется избегать дозирования объёмов менее 2 мкл.

3. Измерение флуоресценции

Измерьте интенсивность флуоресценции стандартных растворов ДНК и экспериментальных образцов ДНК (краситель, связанный с молекулой двухцепочечной ДНК, имеет максимум поглощения при длине волны 503 нм и максимум испускания при 525 нм).

4. Расчет концентрации ДНК

Постройте калибровочную кривую, используя данные об уровне флуоресценции стандартных растворов. Аппроксимируйте данные линейной функцией, найдите параметры функции А и В. Линейное уравнение зависимости флуоресценции (FL) от концентрации С выглядит следующим образом:

$FL = A \times C + B$, где FL — интенсивность флуоресценции в условных единицах, а C — концентрация ДНК, А и В — параметры линейной функции.

Концентрация ДНК в экспериментальном образце:

$C_{\text{образца}} = (FL_{\text{образца}} - B)/A$, где $FL_{\text{образца}}$ — флуоресценция образца, А и В — параметры найденной линейной функции.

Концентрация ДНК в исходном образце:

$C_{\text{исх}} = V_{\text{образца}} \times C_{\text{образца}} / V_{\text{исх}}$, где $V_{\text{образца}}$ — объем образца и $V_{\text{исх}}$ — объем исходного раствора ДНК, использованный для приготовления экспериментального образца.

Для проведения необходимых вычислений Вы также можете воспользоваться нашими калькуляторами: [для расчета концентрации ДНК](#) и [приготовления/разбавления растворов](#).

Пример уравнения зависимости флуоресценции от концентрации ДНК:

