



QuDye ssDNA Assay Kit manual

Contents

English: QuDye ssDNA Assay Kit manual	3-7
Deutsch: Handbuch für das QuDye ssDNA Kit	8-12
Русский: Инструкция к набору QuDye ssDNA для определения количества одноцепочечной ДНК	13-17

Lumiprobe Corporation
(US and Worldwide)
9:00AM - 9:00PM EST

Phone: +1 888 973 63 53

Lumiprobe GmbH
(Germany and Europe)
8:00AM - 5:00PM CE(S)T

Phone: +49 511 16596811

Lumiprobe RUS Ltd
(Russia and CIS)
8:00 - 19:00 GMT+3 (Moscow)

Phone: +7 800 775 3271



ISO 9001:2015

QuDye ssDNA Assay Kit manual

The kit is intended for quantification of single-stranded DNA (ssDNA) with Qubit™ fluorometer. With this kit you can measure concentration of either oligonucleotide or long ssDNA; free nucleotides do not bind to the dye and do not affect measurement results. QuDye ssDNA reagent does not have selectivity to single-stranded DNA and can also bind to double-stranded DNA (dsDNA) and RNA, so they should be avoided in the sample. Other minor contaminants such as salts, detergents, solvents, and proteins have non-significant effect on measurements results (Table 1), however, it is recommended to minimize or completely eliminate them in the sample.

All reagents are optimized to perform the measurements with Qubit™ fluorometer. The range of ssDNA concentrations measured is from 50 pg/μL to 200 ng/μL for initial sample (final DNA content in the assay tube after diluting the sample in the dye working solution is 1–200 ng).

Kit components

Kit component	Count	
	17102 100 assays	18102 100 assays (incl. tubes)
Polypropylene tube (0.5 mL thin-walled transparent)	—	100
35010, QuDye ssDNA Reagent, 200x, 250 uL	1	1
S3250, TE buffer, 1x, 50 mL	1	1
B9650, Quantitative standard, 0 ng/uL in TE buffer, 1 mL	1	1
B2650, ssDNA quantitative standard, 20 ng/uL in TE buffer, 1 mL	1	1

Store at +4 °C. Warm to RT before use.

Shelf life 12 months.

! All measurements with QuDye ssDNA Assay Kit should be performed at room temperature (22–28 °C). Before starting, equilibrate all kit's solutions to room temperature. When using the kit on a regular basis, store QuDye ssDNA Reagent and 1x TE buffer at room temperature, standards — at +4 °C.

! Please note that fluctuations in sample temperature can significantly affect measurement results. Avoid warming the samples; particularly do not hold the assay tubes in your hands just before fluorescence measurement with a Qubit™ fluorometer. If being in the Qubit™ fluorometer chamber even for a short time, the tube with the sample gets warmer, so perform measurements just after placing the tube with the sample in the fluorometer chamber. If one sample has to be reread, the tube with the sample should be removed from the fluorometer just after reading and placed in the fluorometer chamber only when fluorescence is measured.

Protocol

1. Prepare *QuDye ssDNA dye working solution* taking into account that 200 μL of dye working solution will be required for each sample and for each of the two standards. In order to do that, dilute *QuDye ssDNA reagent* concentrate 200-fold with *1x TE buffer*.

*For example, to measure 3 samples and 2 standards, prepare $200\ \mu\text{L} \times 5 = 1000\ \mu\text{L}$ of dye working solution (mix $5\ \mu\text{L}$ of *QuDye ssDNA reagent* concentrate and $995\ \mu\text{L}$ of *1x TE buffer*).*

! It is recommended to use dye working solution within several hours after preparation. In case of postponed measurements protect prepared dye working solution from light.

*! Use only plastic containers to prepare dye working solution, as *QuDye ssDNA reagent* can adsorb to glass surfaces, which results in decreasing of the dye concentration in samples and biases in the measurement results.*

2. Set up two 0.5 mL tubes (thin-walled and optical-transparent) for the standards and one tube for each sample. Label the tube lids. Do not label the side of the tube as this can interfere with the sample read.
3. To each of two tubes for standards add 190 μL of *QuDye ssDNA dye working solution* and either 10 μL of *Quantitative standard, 0 ng/ μL (Standard #1)* or *ssDNA quantitative standard, 20 ng/ μL (Standard #2)*. Vortex for 2–3 seconds and centrifuge briefly.
4. To each tube for samples add 180–199 μL of *QuDye ssDNA dye working solution* and 20–1 μL of test sample, respectively (the total volume should be 200 μL). Vortex for 2–3 seconds and centrifuge briefly.

The dilution of test sample is optional and depends on its initial concentration. The initial sample concentration should be within the range of 50 pg/ μL —200 ng/ μL . Final DNA content in the assay tube after diluting the sample in the dye working solution should be within the range of 1–200 ng for measurement with a Qubit™ fluorometer. At the same time, avoid pipetting small volumes to dilute the initial sample in order to maintain accuracy and precision of your measurements.

5. Incubate all tubes (containing standards and DNA samples) for 2 minutes at room temperature.
6. Perform the fluorescence measurements.

Fluorescence measurement with a Qubit™ fluorometer

The next steps should be carried out according to the instruction of the Qubit™ fluorometer. Depending on the version of the fluorometer the menu items may differ from the specified below.

1. On the Home screen of the Qubit™ fluorometer, choose **ssDNA** as the assay type. Press **Go**.
2. With each preparation of the dye working solution, calibrate the fluorometer. Select **Run new calibration** and press **Go**.
3. Insert the tube containing *Standard #1* into the sample chamber, close the lid, then press **Go**. When the reading is complete (~3 seconds), remove *Standard #1*. Insert the tube containing *Standard #2* into the sample chamber, close the lid, then press **Go**. When the reading is complete, remove *Standard #2*.
4. Insert the tube containing user sample into the sample chamber, close the lid, then press **Go**. On the screen you will see the QF value.

Calculate the concentration of the sample by the formula: Concentration of the sample = QF value x 200/sample volume.

Table 1. Effect of contaminants on fluorescence when measuring ssDNA concentration with the QuDye ssDNA Assay Kit

Contaminants	Final concentration in test sample	Change in fluorescence (increase ↑ or decrease ↓)	
Sodium acetate	30 mM	↓	Non-significant (less than 10%)
Agarose	0.1%	↑	
Chloroform	2%	↑	
Ammonium acetate	50 mM	↓	Moderate (10-20%)
Phenol	0.2%	↓	
Ethanol	10%	↑	
Triton X-100	0.1%	↑	
Bovine serum albumin	2%	↑	Significant (more than 20%)
IgG	0.1%	↓	
Sodium chloride	100 mM	↓	
Zinc chloride	1 mM	↓	
Magnesium chloride	5 mM	↓	
Urea	2 M	↑	
Sodium dodecyl sulfate	0.01%	↑	
Polyethylene glycol	1%	↑	
ATP	0.1%	↑	

Qubit™ is a trademark of Thermo Fisher Scientific

Handbuch für das QuDye ssDNA Kit

Ein Kit für die Konzentrationsbestimmung einzelsträngiger DNA mit dem Qubit™ Fluorometer. Dieses Kit dient der Quantifizierung sowohl längerer einzelsträngiger DNA als auch kürzerer Oligonukleotide; freie Nukleotide werden vom Farbstoff nicht gebunden und daher nicht mitgemessen. QuDye ssDNA Reagenz bindet nicht selektiv an einzelsträngige DNA sondern auch an doppelsträngige DNA und RNA, deshalb sollte die Probe keine anderen Nukleinsäuren enthalten. Die Restmengen anderer Verunreinigungen wie Salze, Detergenzien, Lösungsmittel, Proteine üben keinen wesentlichen Einfluss auf die Messergebnisse aus (s. Tabelle 1), es wird jedoch empfohlen, die Kontamination der Probe so gering wie möglich zu halten bzw. ganz zu vermeiden.

Alle Reagenzien sind für die Messungen mit dem Qubit™ Fluorometer optimiert, der Messbereich für die Ausgangskonzentrationen der DNA-Proben reicht von 50 pg/μl bis 200 ng/μl (die Endmenge der DNA nach der Zugabe der Ausgangsprobe zur Farbstoffarbeitslösung beträgt 1–200 ng).

Bestandteile

Komponente	Anzahl	
	17102 100 assays	18102 100 assays (incl. tubes)
Polypropylen-Gefäß (dünnwandiges transparentes 0,5 mL)	—	100
35010, QuDye ssDNA Reagenz / QuDye ssDNA Reagent, 200x, 250 µL	1	1
S3250, TE-Puffer, 1x, 50 mL	1	1
B9650, Standard / Quantitative standard, 0 ng/µl in TE-Puffer, 1 mL	1	1
B2650, ssDNA-Standard / ssDNA quantitative standard, 20 ng/µl in TE-Puffer, 1 mL	1	1

Bei +4 °C lagern. Reagenzien vor Gebrauch auf +20 °C temperieren.

Haltbarkeit: 12 Monate.

! Alle Messungen mit QuDye ssDNA Kit werden bei Raumtemperatur (22–28 °C) ausgeführt. Bringen Sie vor Arbeitsbeginn alle Komponente des Kits auf Raumtemperatur. Es wird empfohlen bei ständigem Gebrauch des Kits das QuDye ssDNA Reagenz und den TE-Puffer 1x bei Raumtemperatur, die Standards bei +4 °C zu lagern.

! Wir weisen darauf hin, dass sich die Temperaturschwankungen der Probe maßgeblich auf die Messergebnisse auswirken. Vermeiden Sie die Erwärmung der Proben, insbesondere halten Sie die Röhrchen nicht in den Händen unmittelbar vor den Fluoreszenzmessungen mit Qubit™ Fluorometer. Die Temperatur der Probe steigt selbst nach einer kurzen Verweilzeit im Probenraum des Qubit™ Fluorometer, führen Sie daher die Fluoreszenzmessung direkt nach dem Platzieren der Probe in den Probenraum des Fluorometers durch. Für eine eventuelle Wiederholungsmessung

an der selben Probe entfernen Sie das Röhrchen mit der Probe nach der Messung umgehend aus dem Fluorometer und setzen Sie sie erneut in den Probenraum lediglich für die Dauer der Fluoreszenzmessung ein.

Verfahren

1. Setzen Sie *QuDye ssDNA Farbstoffarbeitslösung* an, wobei für jede Probe und jeden der 2 Standards 200 μl Farbstoffarbeitslösung benötigt werden. Die Farbstoffarbeitslösung erhalten Sie, indem Sie 200x *QuDye ssDNA Farbstoffkonzentrat* mit 1x *TE-Pufferlösung* 200-fach verdünnen.

Stellen Sie beispielsweise zur Messung von 3 Proben und 2 Standards 200 μL x 5 = 1000 μl Farbstoffarbeitslösung her (legen Sie 5 μl QuDye ssDNA Farbstoffkonzentrat und 995 μl 1x TE-Pufferlösung vor).

! Die angesetzte Farbstoffarbeitslösung ist innerhalb von wenigen Stunden aufzubrauchen. Erfolgt die Messung nicht sofort, lagern Sie die angesetzte Farbstoffarbeitslösung lichtgeschützt.

! Verwenden Sie zur Herstellung der Farbstoffarbeitslösung ausschließlich Kunststoffgefäße. Ein Glasgefäß kann den Farbstoff adsorbieren, was zur Verringerung der Farbstoffkonzentration in den Proben und Beeinflussung der Messergebnisse führen kann.

2. Bereiten Sie zwei dünnwandige, optisch durchlässige 0,5-ml-Röhrchen für die Standards und ein Röhrchen je Probe vor. Beschriften Sie die Röhrchendeckel (nicht jedoch die Röhrchenwand, da dies das korrekte Ablesen der Probe stören kann).
3. Pipettieren Sie in jedes Standardröhrchen 190 μl *QuDye ssDNA Farbstoffarbeitslösung* und 10 μl *Quantitative standard, 0 ng/ μl (Standard #1)* bzw. *ssDNA quantitative standard, 10 ng/ μl (Standard #2)*. Vortexen Sie für 2–3 Sekunden und zentrifugieren Sie kurz an.
4. Pipettieren Sie in jedes Probenröhrchen 180–199 μl *QuDye ssDNA Farbstoffarbeitslösung* und 20–1 μl DNA-Probe (das Endvolumen in jedem Röhrchen soll 200 μL betragen). Vortexen Sie für 2–3 Sekunden und zentrifugieren Sie kurz an.

Die Verdünnung der DNA-Probe ist optional und hängt von der Ausgangskonzentration ab. Die Ausgangskonzentration muss im Bereich von 50 pg/μl bis 200 ng/μl liegen. Die Endmenge der DNA nach der Zugabe der Ausgangsprobe zur Farbstoffarbeitslösung muss 1–200 ng für Messungen mit Qubit™ Fluorometer betragen. Dabei sollten kleine Pipettierolumina zur Verdünnung der Ausgangsprobe vermieden werden, um die Genauigkeit und Präzision der Messungen zu gewährleisten.

5. Inkubieren Sie alle Röhrchen (mit Standards und DNA-Proben) für 2 Minuten bei Raumtemperatur.
6. Führen Sie Fluoreszenzmessungen durch.

Fluoreszenzmessung mit Qubit™ Fluorometer

Folgende Schritte sollen gemäß der Anleitung für das Qubit™ Fluorometer durchgeführt werden. Je nach Ausführung des Fluorometers können sich Menüpunkte von den unten genannten unterscheiden.

1. Wählen Sie nach dem Einschalten des Geräts **ssDNA**. Drücken Sie **Go**.
2. Das Fluorometer muss jedes Mal nach Herstellung einer frischen Farbstoffarbeitslösung neu kalibriert werden. Wählen Sie **Run new calibration** und drücken Sie **Go**.
3. Setzen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #1* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie **Go**. Nach Ablesen der Messwerte (etwa 3 Sekunden) entfernen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #1*. Setzen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #2* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie **Go**. Nach Ablesen der Messwerte entfernen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #2*.
4. Nach Abschluss der Kalibrierung setzen Sie das Röhrchen mit der DNA-Probe in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie **Go**. Auf dem Display wird nun der QF Wert angezeigt.

Sie können die DNA-Konzentration anhand der folgenden Formel berechnen: DNA-

Probenkonzentration = QF Wert x 200/Probenvolumen oder geben Sie das Probenvolumen ins Fluorometer ein.

Tabelle 1. Einfluss der Verunreinigungen auf die Fluoreszenzintensität bei Quantifizierung von ssDNA mittels QuDye ssDNA Kit

Verunreinigungen	Endkonzentration in der Probe	Veränderung der Fluoreszenzintensität (Erhöhung ↑ oder Erniedrigung ↓)	
Natriumacetat	30 mM	↓	gering (weniger als 10%)
Agarose	0.1%	↑	
Chloroform	2%	↑	
Ammoniumacetat	50 mM	↓	mäßiggradig (10-20%)
Phenol	0.2%	↓	
Ethanol	10%	↑	
Triton X-100	0.1%	↑	
Bovines Serumalbumin	2%	↑	signifikant (mehr als 20%)
IgG	0.1%	↓	
Natriumchlorid	100 mM	↓	
Zinkchlorid	1 mM	↓	
Magnesiumchlorid	5 mM	↓	
Harnstoff	2 M	↑	
SDS	0.01%	↑	
Polyethylenglykol	1%	↑	
ATP	0.1%	↑	

Qubit™ ist eine Marke von Thermo Fisher Scientific

Инструкция к набору QuDye ssDNA для определения количества одноцепочечной ДНК

Набор предназначен для определения концентрации одноцепочечной ДНК на флуориметре Qubit™. С помощью данного набора может быть измерена концентрация как длинной одноцепочечной ДНК, так и коротких олигонуклеотидов; свободные нуклеотиды не связываются с красителем и не влияют на результаты измерений. Краситель QuDye ssDNA не обладает селективностью по отношению к одноцепочечной ДНК и также связывает двухцепочечную ДНК и РНК, поэтому следует исключить их присутствие в образце. Другие примеси в незначительном количестве, такие как соли, детергенты, растворители, белки оказывают несущественное влияние на результаты измерений (Табл. 1), однако рекомендуется минимизировать или полностью исключить их присутствие в образце.

Все поставляемые реагенты оптимизированы для работы на флуориметре Qubit™, диапазон измеряемых концентраций ДНК составляет 50 пг/мкл–200 нг/мкл для исходного образца (конечное содержание ДНК в пробирке после разбавления образца в рабочем растворе красителя 1–200 нг).

Состав набора

Компонент набора	Количество	
	17102 100 assays	18102 100 assays (incl. tubes)
Пробирка тонкостенная (0.5 mL прозрачный полипропилен)	—	100
35010, Краситель QuDye ssDNA / QuDye ssDNA Reagent, 200x, 250 µL	1	1
S3250, Буфер TE, 1x, 50 mL	1	1
B9650, Стандарт / Quantitative standard, 0 нг/мкл в TE буфере, 1 mL	1	1
B2650, Стандарт оцДНК / ssDNA quantitative standard, 20 нг/µL в TE буфере, 1 mL	1	1

Хранить при температуре +4 °С. Прогреть до +20 °С перед использованием.

Срок хранения 12 месяцев.

! Все измерения с использованием набора QuDye ssDNA должны проводиться при комнатной температуре (22–28 °С). Перед началом работы тщательно прогрейте все используемые растворы до комнатной температуры. При постоянном использовании набора рекомендуется хранить краситель QuDye ssDNA и 1х буфер TE при комнатной температуре, стандарты при температуре +4 °С.

! 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 Qubit™ 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.

Протокол

1. Приготовьте рабочий раствор красителя QuDye ssDNA из расчета, что на каждый образец и на каждый из двух стандартов потребуется около 200 мкл. Для этого разведите 200х концентрат красителя QuDye ssDNA в 200 раз 1х TE буфером.

Например, для измерения 3 образцов и 2 стандартов необходимо приготовить 200 мкл x 5 = 1000 мкл рабочего раствора красителя (смешайте 5 мкл концентрата красителя QuDye ssDNA и 995 мкл 1х TE буфера).

! Рабочий раствор красителя рекомендуется использовать в течение нескольких часов после приготовления. При проведении отсроченных измерений рекомендуется беречь от света готовый рабочий раствор красителя.

! Для приготовления рабочего раствора красителя используйте только пластиковую посуду. Стелянная посуда может сорбировать на своих стенках краситель, что приведет к снижению концентрации красителя в образцах и искажению результатов измерений.

2. Подготовьте две тонкостенные, оптически прозрачные 0.5 мл пластиковые пробирки для стандартов и по одной пробирке для каждого измеряемого образца. Подпишите крышки пробирок (не делайте пометок на стенках пробирок, так как это может привести к некорректному определению интенсивности флуоресценции).
3. В каждую пробирку для стандартов внесите 190 мкл *рабочего раствора красителя QuDye ssDNA* и 10 мкл *Quantitative standard, 0 ng/μL (Стандарт #1)* и *ssDNA quantitative standard, 20 ng/μL (Стандарт #2)* соответственно. Перемешайте на вортексе 2–3 секунды, сбросьте капли.
4. В каждую пробирку для образцов внесите 180–199 мкл *рабочего раствора красителя QuDye ssDNA* и 20–1 мкл образца соответственно (конечный объем в каждой пробирке должен составить 200 мкл). Перемешайте на вортексе 2–3 секунды, сбросьте капли.

Разведение исследуемого образца опционально и зависит от его исходной концентрации. Исходная концентрация образца должна соответствовать диапазону 50 пг/мкл–200 нг/мкл; Для измерений на флуориметре Qubit™ конечное содержание ДНК в пробирке после разбавления образца в рабочем растворе красителя должно находиться в диапазоне 1–200 нг. В то же время следует избегать использования маленьких объемов при разбавлении исходного образца, поскольку неточность пипетирования маленьких объемов может сказаться на результатах измерений.

5. Инкубируйте все пробирки (содержащие стандарты и исследуемые образцы) 2 минуты при комнатной температуре.
6. Проведите измерение интенсивности флуоресценции.

Измерение интенсивности флуоресценции на флуориметре Qubit™

Следующие пункты следует выполнять согласно инструкции к флуориметру Qubit™. В зависимости от версии флуориметра пункты меню могут отличаться от приведенных ниже.

1. После включения прибора выберите пункт **ssDNA**. Нажмите **Go**.
2. При каждом новом приготовлении рабочего раствора красителя следует проводить калибровку флуориметра. Выберите пункт **Run new calibration** и нажмите **Go**.
3. Поместите в гнездо пробирку, содержащую *стандарт #1*, закройте крышку, нажмите **Go**. Когда прибор проведет измерение (около 3 сек), удалите пробирку со *стандартом #1*. Поместите в гнездо пробирку, содержащую *стандарт #2*, закройте крышку, нажмите **Go**. Когда прибор проведет измерение, удалите пробирку со *стандартом #2*.
4. После успешного завершения калибровки поместите в гнездо пробирку с экспериментальным образцом, закройте крышку, нажмите **Go**. На экране прибор покажет значение QF Value.

Рассчитайте концентрацию ДНК по формуле: Концентрация ДНК в образце = значение QF x 200/объем образца; или введите объем образца в прибор.

Таблица 1. Влияние примесей на интенсивность флуоресценции при измерении концентрации одноцепочечной ДНК набором QuDye ssDNA

Примеси	Конечная концентрация в измеряемом образце	Изменение интенсивности флуоресценции (увеличение ↑ или уменьшение ↓)	
Ацетат натрия	30 мМ	↓	Незначительное (менее 10%)
Агароза	0.1%	↑	
Хлороформ	2%	↑	
Ацетат аммония	50 мМ	↓	Умеренное (10-20%)
Фенол	0.2%	↓	
Этанол	10%	↑	
Тритон X-100	0.1%	↑	
Бычий сывороточный альбумин	2%	↑	Существенное (более 20%)
IgG	0.1%	↓	
Хлорид натрия	100 мМ	↓	
Хлорид цинка	1 мМ	↓	
Хлорид магния	5 мМ	↓	
Мочевина	2 М	↑	
SDS	0.01%	↑	
Полиэтиленгликоль	1%	↑	
АТФ	0.1%	↑	

Qubit™ — зарегистрированная торговая марка Thermo Fisher Scientific

Lumiprobe Corporation

(US and Worldwide)

9:00AM - 9:00PM EST

201 International Circle, Suite 135

Hunt Valley, Maryland 21030

USA

Phone: +1 888 973 63 53

Lumiprobe GmbH

(Germany and Europe)

8:00AM - 5:00PM CE(S)T

Feodor-Lynen-Strasse 23

30625 Hannover

Germany

Phone: +49 511 16596811

Lumiprobe RUS Ltd

(Russia and CIS)

8:00 - 19:00 GMT+3 (Moscow)

Kotsyubinskogo 4, bld. 3

121351 Moscow

Russian Federation

Phone: +7 800 775 3271



ISO 9001:2015

Issued by TÜV NORD CERT GmbH

www.lumiprobe.com