

Определение концентрации двухцепочечной ДНК с помощью красителя Pico488

[Краситель Pico488 для определения концентрации ДНК](#) представляет собой высокочувствительный реагент для определения малых 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. Структура красителя Pico488 идентична структуре красителя PicoGreen®.

Линейный диапазон измерения концентрации ДНК с помощью красителя Pico488 составляет 1 пг/мкл - 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 Pico488 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 Pico488 входят в состав [набора Pico488](#). [Краситель Pico488](#) также доступен для заказа отдельно. Раствора красителя объемом 1 мл достаточно для проведения 200 измерений для образца объемом 2 мл (минимально необходимый объём образца для измерений в стандартной флуориметрической кювете объёмом 3.5 мл). Количество измерений может варьировать в зависимости от объема образца. Рекомендуемые объёмы образца для наиболее популярного флуориметрического оборудования представлены ниже в таблице.

Протокол

1. Приготовление рабочего раствора Pico488.

Разморозьте и тщательно перемешайте содержимое пробирки с красителем. Приготовьте достаточное количество рабочего раствора красителя для всех образцов (исследуемые образцы и стандартные растворы ДНК): объём рабочего раствора красителя должен составить 50% от общего объёма измеряемого образца (уточните в таблице ниже рекомендуемый объём образца для используемого оборудования). Разведите необходимое количество красителя Pico488 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 объёма рабочего раствора красителя Вы можете воспользоваться следующей формулой:

$V_{Pico488} = 5/8 \times V_{образца} \times (N_{образцов} + N_{стандартов})$, где $V_{образца}$ - измеряемый объём исследуемого образца или стандарта, $N_{образцов}$ - количество измеряемых образцов, и $N_{стандартов}$ - 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 Pico488. 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 Pico488](#). При заказе [красителя Pico488](#) отдельно (не в составе набора), поставка стандартного раствора ДНК не предусмотрена.

Рекомендуемые объёмы для измерения концентрации ДНК с помощью красителя Pico488:

Тип оборудования	Общий объём образца	Объём рабочего раствора красителя Pico488	Объём экспериментального образца ДНК
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
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 A и B.

Линейное уравнение зависимости флуоресценции (FL) от концентрации (C) выглядит следующим образом:

$FL = A \times C + B$, где FL - интенсивность флуоресценции в усл. ед., а C - концентрация ДНК, нг/мл, A и B - параметры линейной функции.

Концентрация ДНК в экспериментальном образце:

$C_{sample} = (FL_{sample} - B)/A$, где FL_{sample} - флуоресценция образца, A и B - параметры найденной линейной функции.

Концентрация ДНК в исходном образце:

$C_{init} = V_{assay} \times C_{sample}/V_{init}$, где V_{assay} - объём образца, мкл и V_{init} - объём исходного образца ДНК, использованный для приготовления экспериментального образца, мкл

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:



PicoGreen®, NanoDrop™ - зарегистрированные торговые марки Thermo Fisher Scientific.