

СинКвант BR ДНК

Набор реагентов для измерения концентрации двуцепочечной ДНК

Краткая инструкция

1. Описание набора.

1.1. Набор реагентов «СинКвант BR ДНК» предназначен для измерения концентрации ДНК в диапазоне от 1 нг/мкл до 1000 нг/мкл с использованием флуориметров для определения концентрации ДНК, окрашенной ДНК-специфичными интеркалирующими флуоресцентными красителями ($\lambda_{ex}=480\pm10$ нм / $\lambda_{em}=530\pm10$ нм).

1.2. Рекомендуемый режим хранения красителя SyDye BR ДНК +2°C – +25°C в тёмном месте (фольгированном пакете). Рекомендуемый температурный режим длительного (>2 недель) хранения стандартов ДНК +2°C – +8°C. Допускается заморозка всех компонентов набора. После размораживания перед использованием тщательно перемешивайте каждый компонент на вортексе в течение 5 – 10 секунд. Избегайте множественных циклов оттаивания/замораживания стандартов ДНК.

1.3. Перед началом измерений необходимо привести все реактивы до достижения ими температуры в помещении. Рекомендуемая температура для проведения измерений +18°C – +25°C. Колебания температуры при измерении могут влиять на точность и воспроизводимость.

- *Перед началом работ по измерению концентрации ДНК, внимательно ознакомьтесь с инструкцией к данному набору и руководством к используемым приборам.*
- *Не подвергайте образец ДНК, окрашенный SyDye BR ДНК воздействию яркого света перед проведением измерений. Это может негативно сказаться на точности и воспроизводимости измерений.*

Компонент	E-024-100	E-024-250	E-024-1250
Краситель SyDye BR ДНК 200-кратный в ДМСО	100 мкл	250 мкл	1250 мкл
СинКвант BR ДНК стандарт#1 0 нг/мкл	200 мкл	500 мкл	2500 мкл
СинКвант BR ДНК стандарт#2 100 нг/мкл	200 мкл	500 мкл	2500 мкл
СинКвант BR ДНК буфер 1-кратный	20 мл	50 мл	2X125 мл

Таблица 1. Состав набора.

2. Подготовка образцов и стандартов к измерению. Общие положения.

2.1. Установите в штативе необходимое количество (по числу измеряемых образцов + пробирки для стандартов) тонкостенных прозрачных пластиковых пробирок объёмом 0.5 мл или 0.2 мл согласно и рекомендациям к использованию расходных материалов в инструкции к прибору.

2.2. Сделайте отметки маркером на крышках пробирок. Не допускается размещение надписей на боковых стенках пробирок. Пометки на пробирках, содержащих стандарты ДНК, должны отличаться, т.к. для успешной калибровки важен порядок измерения стандартов.

2.3. Приготовьте рабочий раствор для измерений (далее – **PP**). Раствор пригоден для использования в течение следующих 2 часов при условии содержания его в затемнённом месте. Для приготовления **PP** в нужно растворить в отдельном флаконе (и перемешать) 200-кратный

краситель SyDye BR ДНК в 1-кратном буфере СинКвант BR ДНК в соотношении 1:200. При этом важно приготовить **PP** в объеме достаточном для проведения всех калибровок и измерений образцов за один подход. Для расчёта необходимого общего объема **PP** можно использовать следующую формулу:

$$V_{PP} = V_{KOH} \times (2 \times (K+1) + N_{OBR})$$

- где
- V_{PP} – общий объем **PP**
 - V_{KOH} – конечный объем готовой смеси в пробирке при измерении/калибровке (по умолчанию $V_{KOH} = 1$)
 - K – число лунок, в которых будут проводиться калибровка и измерения (например, для прибора Qubit™ Fluorimeter $K = 1$, для приборов Qubit™ Flex Fluorimeter и QUBIX – K может быть числом от 1 до 8)
 - N_{OBR} – число образцов ДНК к измерению

Количество измерений	Краситель SyDye BR ДНК	СинКвант BR ДНК буфер
1	1 мкл	199 мкл
3	3 мкл	597 мкл
10	10 мкл	1990 мкл

Таблица 2. Схема приготовления рабочего раствора «PP». Пример расчёта на 1, 3 и 10 измерений в объёме 200 мкл готового раствора.

- При проведении измерения на приборах Qubit™ Fluorimeter (и аналогичных) V_{KOH} должен составлять 200 мкл. Для калибровочного измерения нужно использовать 10 мкл стандарта ДНК (V_{STD}). Таким образом, для одного калибровочного измерения необходимо смешать $V_{STD} = 10$ мкл стандарта и $V_{PP} = 190$ мкл предварительно подготовленного **PP**.

Количество измерений	Стандарт Онг/мкл и 100нг/мкл	Образец
Объём PP , V_{PP}	190 мкл	180–199 мкл
Объём стандарта ДНК, V_{STD}	10 мкл	–
Объём образца, V	–	1 – 20 мкл
Конечный объём, V_{KOH}	200 мкл	200 мкл

Таблица 3. Схема приготовления готовой смеси для калибровки и измерения.

Объём образца, V	Диапазон концентраций
1.0 мкл	20–1000 нг/мкл
2.0 мкл	10–500 нг/мкл
5.0 мкл	4–200 нг/мкл
10.0 мкл	2–100 нг/мкл
20.0 мкл	1–50 нг/мкл

Таблица 4. Рекомендованные объёмы вносимого образца для измерения.

- Калибровка производится по двум точкам (стандартам ДНК с концентрациями 0 и 100 нг/мкл соответственно, приготовленным в отдельных пробирках с $V_{KOH} = 200$ мкл готовой смеси в каждой). Сначала регистрируют стандарт с концентрацией 0 нг/мкл, затем 100 нг/мкл.
- Объём измеряемого образца ДНК (далее – V) может составлять от 1 мкл до 20 мкл при сохранении $V_{KOH} = 200$ мкл. Образец нужно смешать с соответствующим V_{PP} от 180 мкл до 199 мкл так, чтобы конечный объём при измерении готовой смеси составлял 200 мкл. При измерении следует учитывать рекомендованные объёмы вносимого образца, которые зависят от предполагаемой концентрации ДНК (таб. 4).

2.4. Добавьте по 10 мкл каждого стандарта в соответствующую пробирку.

- 2.5. Добавьте нужный объём каждого образца в соответствующую пробирку (1-20 мкл).
- 2.6. Встряхните пробирки на центрифуге-вортексе в течение 2-3 секунд. Осадите капли кратким центрифугированием пробирки.
- 2.7. Проследите, чтобы в растворе на дне пробирки не оставалось воздушных пузырьков и капель жидкости на стенках пробирки. При необходимости удалите их при помощи центрифугирования.
- 2.8. Полученные растворы проинкубируйте 2–3 минуты в затемнённом месте при комнатной температуре. Образцы готовы к проведению измерений в течение следующих 2 часов при условии содержания его в затемнённом месте.

3. Калибровка и измерение образцов на Qubit™ Fluorimeter.

- 3.1. Выберите режим «**DNA**», затем «**DNA Broad Range**». Выберите команду «**Read standards**». Для использования предыдущей калибровки нужно перейти к п. 4. Для новой калибровки – п. 2.
- 3.2. Установите в камеру для измерения пробирку, содержащую предварительно подготовленный стандарт ДНК с концентрацией 0 нг/мкл. Закройте крышку камеры, выберите команду «**Read standard**». По окончании измерения извлеките пробирку.
- 3.3. Установите в камеру для измерения пробирку, содержащую предварительно подготовленный стандарт ДНК с концентрацией 100 нг/мкл. Закройте крышку камеры, выберите команду «**Read standard**». По окончании измерения извлеките пробирку.
- 3.4. Выберите команду «**Run samples**». При помощи интерактивного меню введите значение объёма исходного раствора ДНК, использованного для измерения (допустимые значения 1 μ L – 20 μ L).
- 3.5. Установите в камеру для измерения пробирку, содержащую подготовленный образец. Закройте крышку камеры, выберите команду «**Read tube**». По окончании измерения извлеките пробирку. Запишите измеренное значение концентрации ДНК.

4. Калибровка и измерение образцов на Qubit™ Flex Fluorimeter.

- 4.1. Выберите на дисплее режим «**DNA Broad Range (BR)**». Затем выберите команду «**Read standards & run samples**». Если вы предпочитаете использовать результаты предыдущей калибровки, то нужно выбрать режим «**Run samples**» и переходить к п. 4. Для новой калибровки – перейти к п. 2.
- 4.2. Установите в камеру для измерения стрипованные пробирки, содержащие подготовленный стандарт ДНК с концентрацией 0 нг/мкл. Закройте крышку камеры, выберите команду «**Run standards**». По окончании измерения извлеките пробирки.
- 4.3. Установите в камеру для измерения пробирки, содержащие подготовленный стандарт ДНК с концентрацией 100 нг/мкл. Закройте крышку камеры, выберите команду «**Run standards**». По окончании измерения извлеките пробирки.
- 4.4. Выберите появившуюся на экране команду «**Next**». После запроса вставьте стрипованные пробирки с вашими образцами как показано на экране. Если пробирок для измерения меньше восьми, то нужно снять выделение с позиций, не содержащих образец.
- 4.5. Выберите единицы размерности концентраций образцов.
- 4.6. При помощи интерактивного меню «**Sample volume**» введите значение объёма исходного раствора ДНК, использованного для измерения (допустимые значения 1 μ L – 20 μ L).

4.7. Установите в камеру для измерения пробирки, содержащие подготовленные образцы. Закройте крышку камеры, выберите команду **«Run samples»**. По окончании измерения извлеките пробирки. Для измерения следующих образцов выберите команду **«Add samples»**.

4.8. Перейдите в режим отображения результатов измерений в виде списка, сохраните измеренные значения концентрации ДНК.

5. Калибровка и измерение образцов на флуориметре QUBIX™.

- На приборах серии **QUBIX™** калибровка и измерение концентрации ДНК может быть осуществлена при $V_{\text{кон}}$ менее 200 мкл (согласно инструкции к прибору). В этом случае важно чтобы $V_{\text{кон}}$ при калибровке прибора и измерении концентрации ДНК образцов был одним и тем же. Например, если калибровка производилась $V_{\text{кон}} = 100$ мкл, то измерение концентрации ДНК образцов также должно производиться в 100 мкл и. т.д. По умолчанию значение $V_{\text{кон}}$ составляет 200 мкл.

5.1. Выберите команду **«Создать новый протокол»**, проверьте основные параметры: **«Тип протокола»** – **«ДНК»**, **«Общий объём, мкл»** – **«200»** (значение по умолчанию), **«Объём стандарта, мкл»** – **«10»** (значение по умолчанию).

5.2. Выберите лунки, в которых будет проводиться калибровка и измерение (от 1 до 8). Проверьте параметры калибровки: **«Уровень концентрации»** – **«BR»**, **«Единицы измерения»** – **«нг/мкл»** (значение по умолчанию), **«Концентрация 1 стандарта»** – **«0,00»** (значение по умолчанию), **«Концентрация 2 стандарта»** – **«100,00»**.

5.3. Выберите команду **«Старт»** для начала калибровки.

5.4. Установите в камеру для измерения стрипованные пробирки, содержащие подготовленный стандарт ДНК с концентрацией 0 нг/мкл. Закройте крышку камеры, выберите команду **«Измерение»**. По окончании измерения извлеките пробирки.

5.5. Установите в камеру для измерения стрипованные пробирки, содержащие подготовленный стандарт ДНК с концентрацией 100 нг/мкл. Закройте крышку камеры, выберите команду **«Измерение»**. По окончании измерения извлеките пробирки.

5.6. После проведения калибровки откроется страница измерения образцов. В команде **«Лунки для измерения»** укажите необходимое количество лунок. Установите пробирки с образцом в лунки. Заполните ячейки **«Объём образца»** укажите объём измеряемого образца до разведения (рекомендованный объём исходного образца 1-20 мкл). При выборе команды **«Все лунки»** позволяет проводить измерения для всех образцов одновременно. Далее выберите необходимое количество лунок для измерения, задайте параметры и нажмите **«Измерить»**. По окончании измерения извлеките стрип или пробирку. Для просмотра истории измерений выберите команду **«Результаты»**.

ООО «НПФ Синтол»

Рекламации на набор реактивов и запросы на техническую поддержку направлять по адресу: 125499, РФ, г. Москва, Кронштадтский б-р, д. 39, корп.1, пом. 1, ком. 43/PM 12-3, email: syntol@syntol.ru, www.syntol.ru
тел. +7 (495) 984-69-93 многоканальный, +7 (499) 977-74-55, +7 (495) 506-79-97