



Handbuch für das QuDye® dsDNA HS Kit

Contents

Deutsch: Handbuch für das QuDye® dsDNA HS Kit	3-7
---	-----

Handbuch für das QuDye® dsDNA HS Kit

Dieses Kit dient der Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA mit dem Fluorometer. QuDye® dsDNA HS Reagenz bindet selektiv an doppelsträngige DNA, sodass Nukleotide, einzelsträngige DNA, RNA, Proteine und andere Verunreinigungen keinen Einfluss auf die Messergebnisse haben. Alle Reagenzien sind für die Messungen mit Fluorometer optimiert, der Messbereich für die Ausgangskonzentrationen der DNA-Proben reicht von 10 pg/µl bis 100 ng/µl.

Bestandteile

Komponente	Anzahl			
	12102 100 assays	13102 100 assays	52102 500 assays	53102 500 assays
33010, QuDye® dsDNA HS Reagenz / QuDye® dsDNA HS Reagent, 200×, 250 µl	1	1	—	—
B9650, Standard / Quantitative standard, 0 ng/ul in TE-Puffer, 1 mL	1	1	—	—
B7650, dsDNA-Standard / dsDNA quantitative standard, 10 ng/ul in TE-Puffer, 1 mL	1	1	—	—
G2150, TE-Puffer, 20x, 5 mL	1	1	—	—
33115, Polypropylen-Gefäß (dünnwandiges transparentes 0,5 mL), 100 pcs	—	1	—	5
63010, QuDye® dsDNA HS Reagenz / QuDye® dsDNA HS Reagent, 200×, 1.25 mL	—	—	1	1
G9650, Standard / Quantitative standard, 0 ng/ul in TE-Puffer, 5 mL	—	—	1	1
G7650, dsDNA-Standard / dsDNA quantitative standard, 10 ng/ul in TE-Puffer, 5 mL	—	—	1	1
N2150, TE-Puffer, 20x, 25 mL	—	—	1	1

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

Haltbarkeit: 12 Monate.

! Alle Messungen mit QuDye dsDNA HS Kit werden bei Raumtemperatur (22–28 °C) ausgeführt. Bringen Sie vor Arbeitsbeginn alle Komponente des Kits auf Raumtemperatur. Vermeiden Sie die Erwärmung der Proben, denn die Temperatur der Proben beeinflusst Messergebnisse, insbesondere halten Sie die Röhrchen nicht in den Händen unmittelbar vor den Fluoreszenzmessungen mit Fluorometer.

Verfahren

1. Setzen Sie 1x TE-Puffer an, wobei für jede Probe und jeden Standard 200 µL 1x TE-Puffer benötigt werden. Den 1x TE-Puffer erhalten Sie, indem Sie 20x TE Konzentrat mit deionisiertem Wasser 20-fach verdünnen.
2. Setzen Sie QuDye dsDNA HS Farbstoffarbeitslösung an, wobei für jede Probe und jeden Standard 200 µL Farbstoffarbeitslösung benötigt werden. Die Farbstoffarbeitslösung erhalten Sie, indem Sie 200x QuDye dsDNA HS Farbstoffkonzentrat mit 1x TE-Pufferlösung 200-fach verdünnen.

Zur Messung von 3 Proben und 2 Standards stellen Sie beispielsweise 200 µL x 5 = 1000 µL 1x TE-Puffer und 1000 µL Farbstoffarbeitslösung her (legen Sie 5 µL QuDye dsDNA HS 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.

3. Bereiten Sie 2 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).

4. Pipettieren Sie in jedes Standardröhrchen 190 μl *QuDye dsDNA HS Farbstoffarbeitslösung* und 10 μl *Quantitative standard, 0 ng/ μl (Standard #1)* bzw. *dsDNA quantitative standard, 10 ng/ μl (Standard #2)*. Vortexen Sie für 2–3 Sekunden und zentrifugieren Sie kurz an.
5. Pipettieren Sie in jedes Probenröhrchen 180–199 μl *QuDye dsDNA HS Farbstoffarbeitslösung* und 20–1 μl DNA-Probe (Das Endvolumen muss 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 der DNA-Proben kann im Bereich von 10 pg/ μl bis 100 ng/ μl liegen. Die Endmenge der DNA sollte jedoch nach Verdünnung der Ausgangsprobe mit QuDye dsDNA HS Farbstoffarbeitslösung innerhalb des Messbereichs vom Fluorometer liegen, d. h. 0,2–100 ng in 200 μl der zu messenden DNA-Probe. Somit muss die Ausgangsprobe mit einer minimal zulässigen DNA-Ausgangskonzentration von 10 pg/ μl 10-fach auf 1 pg/ μl verdünnt werden (mischen Sie dafür in einem Probenröhrchen 180 μl der Farbstoffarbeitslösung und 20 μl der Ausgangsprobe mit 10 pg/ μl , was 0,2 ng DNA entspricht); die Ausgangsprobe mit einer maximal zulässigen DNA-Ausgangskonzentration von 100 ng/ μl muss 200-fach verdünnt werden (mischen Sie dafür in einem Probenröhrchen 199 μl der Farbstoffarbeitslösung mit 1 μl der Ausgangsprobe mit 100 ng/ μl , das entspricht 100 ng DNA). Dabei sollten kleine Pipettierolumina zur Verdünnung der Ausgangsprobe vermieden werden, um die Genauigkeit und Präzision der Messungen zu gewährleisten.
6. Inkubieren Sie alle Röhrchen (mit Standards und DNA-Proben) für 3–5 Minuten bei Raumtemperatur.
7. Führen Sie Fluoreszenzmessungen durch.

Fluoreszenzmessung mit Fluorometer

Führen Sie die nachfolgenden Schritte gemäß der Anleitung für das Fluorometer durch. Je nach Ausführung des Fluorometers können sich Menüpunkte von den unten genannten unterscheiden.

1. Schalten Sie das Gerät ein und wählen Sie den Menüpunkt **DNA**, danach **dsDNA High Sensitivity**.
2. Das Gerät öffnet automatisch die Registerkarte **Standards**. Das Fluorometer ist nach jedem Ansetzen einer frischen Farbstoffarbeitslösung neu zu kalibrieren. Sie dürfen aber auch eine zuletzt gespeicherte Kalibrierung benutzen, wenn alle Messbedingungen inklusive der Temperatur im Labor gleich geblieben sind. Drücken Sie in diesem Fall **No** in der Registerkarte **Standards**. Das Gerät öffnet jetzt die Registerkarte **Sample**, in der nun die Fluoreszenzmessung der Proben erfolgen kann. Gehen Sie zum Schritt 3 über.

Um das Gerät neu zu kalibrieren, drücken Sie in der Registerkarte **Standards** auf **Yes**. Setzen Sie das Röhrchen mit dem *Standard #1* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie **Read**. Entfernen Sie nach Ablesen der Messwerte (etwa 3 Sekunden) das Röhrchen mit dem *Standard #1*. Setzen Sie nun das Röhrchen mit dem *Standard #2* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie **Read**. Entfernen Sie nach Ablesen der Messwerte das Röhrchen mit dem *Standard #2*. Nach Abschluss der Kalibrierung öffnet das Gerät die Registerkarte **Sample**, in der nun die Fluoreszenzmessung der Proben erfolgen kann.

3. Setzen Sie das Röhrchen mit der DNA-Probe in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie **Read** in der geöffneten Registerkarte **Sample**. Nach Abschluss der Messung wird auf dem Display der QF-Wert angezeigt.

Der QF-Wert gibt die DNA-Konzentration nach Verdünnung der Ausgangsprobe in einem Probenröhrchen an. Sie können die DNA-Konzentration in der Ausgangsprobe anhand der folgenden Formel berechnen:

DNA-Ausgangsprobenkonzentration (ng/ml) = QF-Wert x 200/V, wo

- V (µl) – Volumen der Ausgangsprobe, das ins Probenröhrchen gegeben

- wurde (1–20 μ l),
- QF - Messwert auf dem Display des Fluorometers (ng/ml).

Wiederholen Sie den Vorgang für alle zu messenden Proben.

Sie können die DNA-Ausgangskonzentration auch über den Rechner am Fluorometer («Dilution Calculator») ausrechnen.







22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

