



Handbuch für das QuDye dsDNA BR Kit

Contents

Deutsch: Handbuch für das QuDye dsDNA BR Kit	3-8
--	-----

Handbuch für das QuDye dsDNA BR Kit

Das Kit QuDye dsDNA BR (Broad Range) dient der Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA mit dem Fluorometer. QuDye dsDNA BR Reagenz bindet selektiv an doppelsträngige DNA, sodass die Verunreinigungen in der DNA-Probe wie RNA, einzelsträngige DNA, Nukleotide, Proteine keinen Einfluss auf die Messergebnisse haben. Spuren anderer Verunreinigungen wie Salzen, Detergenzien oder Lösungsmitteln beeinflussen die Messergebnisse zwar kaum, es wird dennoch empfohlen, die Kontamination der Probe so gering wie möglich zu halten bzw. ganz zu vermeiden. Das Kit wurde für die Nutzung mit Fluorometern (alle Ausführungen) optimiert und hat einen Messbereich von 100 pg/µl bis 1000 ng/µl (die DNA-Endmenge sollte nach Verdünnung der Ausgangsprobe 2–1000 ng in 200 µl der zu messenden Probe betragen). Die Messungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt, das Fluoreszenzsignal bleibt für drei Stunden stabil.

Für die Bestimmung von Protein-Verunreinigungen in einer DNA-Probe kann QuDye dsDNA BR Kit zusammen mit dem **QuDye Protein Quantifizierungskit** verwendet werden.

Bestandteile

Komponente	Anzahl						
	A9102	19102	12102	59102	69102	89102	79102
	10	100	100	500	500	1000	1000
	assays	assays	assays	assays	assays	assays	assays
28010, QuDye dsDNA BR Reagenz / QuDye dsDNA BR Reagent, 200×, 30 uL	1	—	—	—	—	—	—
AA650, dsDNA quantitative standard, 100 ng/uL in TE buffer, 100 uL	1	—	—	—	—	—	—

K9650, Standard / Quantitative standard, 0 ng/ul in TE-Puffer, 10 mL	—	—	—	—	—	1	—
KA650, dsDNA quantitative standard, 100 ng/uL in TE buffer, 10 mL	—	—	—	—	—	1	—
B9650, Standard / Quantitative standard, 0 ng/ul in TE-Puffer, 1 mL	1	1	1	5	5	—	10
S4850, QuDye BR Puffer, 1x, 50 mL	1	1	1	5	5	10	10
38010, QuDye dsDNA BR Reagenz / QuDye dsDNA BR Reagent, 200x, 250 uL	—	1	1	—	—	—	—
BA650, dsDNA quantitative standard, 100 ng/uL in TE buffer, 1 mL	—	1	1	5	5	—	10
33115, Polypropylen- Gefäß (dünnwandiges transparentes 0,5 mL), 100 pcs	—	—	1	—	5	—	—
68010, QuDye dsDNA BR Reagenz / QuDye dsDNA BR Reagent, 200x, 1.25 mL	—	—	—	1	1	2	2

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

Haltbarkeit: 12 Monate.

! Alle Messungen mit dem QuDye dsDNA BR Kit sind bei Raumtemperatur (22–28 °C) durchzuführen. Bringen Sie vor Arbeitsbeginn alle Komponenten des Kits ebenfalls auf Raumtemperatur. Es wird empfohlen bei ständigem Gebrauch des Kits den Farbstoff QuDye dsDNA BR und den QuDye BR Puffer 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 Fluorometer. Die Temperatur der Probe steigt selbst nach einer kurzen Verweilzeit im Probenraum des Fluorometers, 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 dsDNA BR Farbstoffarbeitslösung* an, wobei für jede Probe und jeden der 2 Standards 200 µl Farbstoffarbeitslösung benötigt werden. Die Farbstoffarbeitslösung erhalten Sie, indem Sie 200× *QuDye dsDNA BR Farbstoffkonzentrat* mit *QuDye BR Puffer* 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 dsDNA BR Farbstoffkonzentrat und 995 µl QuDye BR Puffer 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 dsDNA BR Farbstoffarbeitslösung* und 10 μl *Quantitative standard, 0 ng/ μl (Standard #1)* bzw. *dsDNA quantitative standard, 100 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 dsDNA BR 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. Achten Sie bitte auf das luftblasenfreie Pipettieren. Zentrifugieren Sie ggf. kurz an, um Luftblasen zu entfernen.

Die Verdünnung der DNA-Probe ist optional und hängt von der Ausgangskonzentration ab. Die Ausgangskonzentration der DNA-Proben kann im Bereich von 100 pg/ μl bis 1000 ng/ μl liegen. Die Endmenge der DNA sollte jedoch nach Verdünnung der Ausgangsprobe mit QuDye dsDNA BR Farbstoffarbeitslösung innerhalb des Messbereichs vom Fluorometer liegen, d. h. 2–1000 ng in 200 μl der zu messenden DNA-Probe. Somit muss die Ausgangsprobe mit einer minimal zulässigen DNA-Ausgangskonzentration von 100 pg/ μl 10-fach auf 10 pg/ μl verdünnt werden (mischen Sie dafür in einem Probenröhrchen 180 μl der Farbstoffarbeitslösung und 20 μl der Ausgangsprobe mit 100 pg/ μl , was 2 ng DNA entspricht); die Ausgangsprobe mit einer maximal zulässigen DNA-Ausgangskonzentration von 1000 ng/ μl muss 200-fach verdünnt werden (mischen Sie dafür in einem Probenröhrchen 199 μl der Farbstoffarbeitslösung mit 1 μl der Ausgangsprobe mit 1000 ng/ μl , das entspricht 1000 ng DNA). 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 3–5 Minuten bei Raumtemperatur.
6. 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 Broad Range**.
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-Ausgangspaltenkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) = 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 (μ g/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

