



Handbuch für das QuDye ssDNA Kit

Contents

Deutsch: Handbuch für das QuDye ssDNA Kit	3-7
---	-----

Handbuch für das QuDye ssDNA Kit

Ein Kit für die Konzentrationsbestimmung einzelsträngiger DNA mit dem 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 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
Polypropylen-Gefäß (dünnwandiges transparentes 0,5 mL)	—	100
35010, QuDye ssDNA Reagenz / QuDye ssDNA Reagent, 200x, 250 uL	1	1
S3250, TE-Puffer, 1x, 50 mL	1	1
B9650, Standard / Quantitative standard, 0 ng/ul in TE-Puffer, 1 mL	1	1
B2650, ssDNA-Standard / ssDNA quantitative standard, 20 ng/ul 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 Röhrcchen nicht in den Händen unmittelbar vor den Fluoreszenzmessungen mit Fluorometer. Die Temperatur der Probe steigt selbst nach einer kurzen Verweilzeit im Probenraum des 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 Röhrcchen 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 Fluorometer betragen. Dabei sollten kleine Pipettier Volumina zur Verdünnung der Ausgangsprobe vermieden werden, um die Genauigkeit und Präzision der Messungen zu gewährleisten.

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

Fluoreszenzmessung mit Fluorometer

Folgende Schritte sollen gemäß der Anleitung für das 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 Röhren 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 Röhren mit dem *Standard #1*. Setzen Sie das Röhren mit dem *Standard #2* in den Probenraum ein, schließen Sie den Deckel und drücken Sie **Go**. Nach Ablesen der Messwerte entfernen Sie das Röhren mit dem *Standard #2*.
4. Nach Abschluss der Kalibrierung setzen Sie das Röhren 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%	↑	
IgG	0.1%	↓	
Natriumchlorid	100 mM	↓	
Zinkchlorid	1 mM	↓	signifikant (mehr als 20%)
Magnesiumchlorid	5 mM	↓	
Harnstoff	2 M	↑	
SDS	0.01%	↑	
Polyethylenglykol	1%	↑	
ATP	0.1%	↑	







22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com

