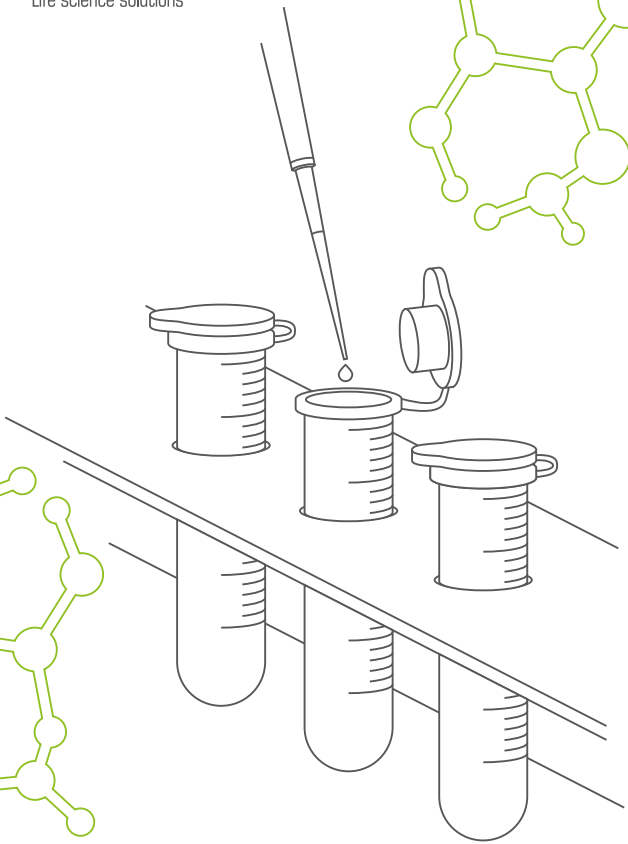
Lumiprobe
Life science solutions



Ribo488 RNA Plate Reader Assay Kit
Handbuch

Lumiprobe Corporation. All rights reserved.

Contents

Deutsch: Ribo488 RNA Plate Reader Assay Kit Handbuch 3-11

DE

Ribo488 RNA Plate Reader Assay Kit Handbuch

Der Ribo488-Farbstoff ist ein hochsensitives und selektives Reagenz, das an RNA bindet, um einen fluoreszierenden Komplex zu bilden und es ermöglicht, die Konzentration von RNA in Lösung mithilfe eines Fluorometers zu bestimmen. Der Farbstoff kann verwendet werden, um die RNA-Konzentration nach der in-vitro-Transkription, vor der Northern-Hybridisierung, in Analysen mit S1-Nuklease, bei der Herstellung von cDNA-Bibliotheken, vor der reversen Transkription usw. zu messen.

Das Ribo488 RNA Plate Reader Assay Kit ermöglicht die Messung der RNA-Konzentration über einen weiten Bereich von 1 ng/ml bis 1000 ng/ml. Hierfür wird das Ribo488-Reagenz in zwei Verdünnungen verwendet, die für einen **hohen** (20 ng/ml — 1000 ng/ml) und einen **niedrigen** (1 ng/ml — 50 ng/ml) RNA-Gehalt in den Proben berechnet sind. Die Selektivität von Ribo488 für die Bindung an RNA ermöglicht es, eine lineare Beziehung in Gegenwart vieler Verunreinigungen wie Nukleotide, Salze, Harnstoff, Ethanol, Chloroform, Detergenzien, Proteine und Agarose aufrechtzuerhalten. Obwohl Ribo488 auch an DNA bindet, ermöglicht die Vorbehandlung der Proben mit DNase nur die Messung von RNA-Konzentrationen.

Dieses Kit ist kompatibel mit Standard-Platten- und Küvettenfluorimetern sowie dem NanoDrop 3300 und den Leserversionen 3.0 und 4.0.

Bestandteile

Komponente	Anzahl	
	11520 200 assays	21520 2000 assays
11510, Ribo488 für die RNA-Quantifizierung, 100 uL	1	—
A0650, RNA-Standard / RNA quantification standard, 100 ng/ul in TE-Puffer, 100 uL	1	—
41510, Ribo488 für die RNA-Quantifizierung, 1 mL	—	1
B0650, RNA-Standard / RNA quantification standard, 100 ng/ul in TE-Puffer, 1 mL	—	1
N9150, TE-Puffer (RNase-frei), 20×, 25 mL	1	1

Transport: bei Raumtemperatur bis zu eine Woche. Lagern bei 2 °C bis 8 °C. Nicht einfrieren!

Haltbarkeit: 12 Monate.

Benötigte Materialien:

- Nukleasefreie Pipetten und Pipettenspitzen (die Verwendung von Spitzen mit einem Filter wird empfohlen);
- Nukleasefreie Kunststoffröhrchen von 15 und 50 ml, Mikroröhrchen von 1,5 ml;
- Nukleasefreies deionisiertes Wasser (zum Beispiel behandelt mit Diethylpyrocarbonat (DEPC));
- Mikroplatten für Tablettenfluorimeter oder Küvetten für Küvettenfluorometer.

Protokoll

! Um mögliche Dosierungsfehler zu vermeiden, empfehlen wir die Herstellung von 1× TE-Puffer und einer Arbeitslösung des Ribo488-Farbstoffs mit einem Spielraum von 10–25%.

! Der Fluoreszenzpegel des RNA/Farbstoff-Komplexes hängt stark von der Temperatur ab, daher sollten vor dem Experiment alle Reagenzien die gleiche Temperatur haben, optimalerweise 22–25 °C.

! Dieses Protokoll ist für die Quantifizierung von RNA auf einem Plattenfluorimeter ausgelegt, kann jedoch auch auf Lesegeräte (Versionen 3.0 und 4.0) im Fluorimetermodus angewendet werden. Wenn ein Küvettenfluorimeter verwendet wird, sollten die in diesem Protokoll angegebenen Volumina proportional zur Küvettenkapazität erhöht werden.

1. Herstellung von 1× TE-Puffer

Um die erforderliche Menge an × TE-Puffer herzustellen, verdünnen Sie den 20-fach TE-Puffer mit DEPC behandeltem deionisiertem Wasser. Verwenden Sie zur Berechnung des erforderlichen Volumens von 1× TE-Puffer die Tabelle mit den empfohlenen Volumina und die folgende Formel:

$$V_{buffer} = V_{sample} \times (N_{samples} + 5) \times 4;$$

wo V_{buffer} das erforderliche Volumen des 1× TE-Puffers in ml; V_{sample} das Gesamtvolumen der Probe in ml; $N_{samples}$ die Anzahl der experimentellen RNA-Lösungen und 5 die Anzahl der Standardlösungen ist.

Zum Beispiel, gemäß der untenstehenden Tabelle beträgt das Gesamtvolumen der Probe (V_{sample}) für einen Platten-Fluorimeter 0,2 ml. Demnach müssen zur Messung der RNA-Konzentration in 10 experimentellen Lösungen 12 ml 1× TE-Puffer vorbereitet werden.

Empfohlene Volumina für die Messung der RNA-Konzentration mit Ribo488-Farbstoff:

Art der Ausrüstung		Volumen der Arbeitslösung des Ribo488-Farbstoffs	Volumen der Standard-RNA-Lösung / Testprobe	Gesamtvolumen der Probe (V_{sample})*
Platten-Fluorimeter	96-Loch-Platte*, pro Vertiefung	0,1 ml	0,1 ml	0,2 ml
	24-Loch-Platte, pro Vertiefung	0,5 ml	0,5 ml	1 ml
	Andere Platten	37,5% des Vertiefungsvolumens	37,5% des Vertiefungsvolumens	etwa 75% des Vertiefungsvolumens
Küvetten-Fluorimeter	Standard fluorimetrische Küvette (3.5 ml)	1 ml	1 ml	2 ml
	Andere fluorimetrische Küvetten	37,5% des Küvettenvolumens	37,5% des Küvettenvolumens	etwa 75% des Küvettenvolumens
NanoDrop™ 3300*		0,05 ml	0,05 ml	0,1 ml

** Das Gesamtvolumen der Probe ist die Summe aus der Farbstofflösung und der Standard-/experimentellen RNA-Lösung, die in gleichen Volumina gemischt werden.*

2. Vorbereitung einer Arbeitslösung des Ribo488-Farbstoffs

2.1. Tauen Sie den Inhalt des Farbstoffröhrchens auf und mischen Sie ihn gründlich. Zentrifugieren Sie eventuelle Tropfen vom Deckel ab.

2.2. Berechnen Sie das Volumen der Arbeitsfarbstoff-Lösung mithilfe der folgenden Formel:

$V_{ribo} = ½ \times V_{buffer}$;

wobei V_{ribo} das benötigte Volumen der Arbeitslösung des Ribo488-Farbstoffs in ml ist und V_{buffer} das Volumen des 1x-TE-Puffers ist, das im Schritt 1 des aktuellen Protokolls berechnet wurde, in ml.

Beispielsweise werden zur Messung von 10 experimentellen RNA-Lösungen auf einem

Plattenfluorimeter 6 ml der Arbeitsfarbstofflösung benötigt.

2.3. Übertragen Sie ein Volumen von 1x TE, das gleich V_{ribo} ist, in ein neues Röhrchen und fügen Sie das Farbstoffkonzentrat aus dem Kit hinzu.

- Um RNA in einem **hohen** Konzentrationsbereich (20 ng/ml bis 1000 ng/ml) zu messen, verdünnen Sie das Ribo488-Farbstoffkonzentrat **200**-fach mit 1× TE-Puffer.
- Um RNA im **niedrigen** Konzentrationsbereich (1 ng/ml — 50 ng/ml) zu messen, verdünnen Sie das Ribo488-Farbstoffkonzentrat **2000**-fach mit dem vorbereiteten 1× TE-Puffer.

Wenn beispielsweise 10 experimentelle Lösungen eine hohe RNA-Konzentration haben sollen, müssen 30 µl Ribo488-Konzentrat zu 6 ml 1× TE-Puffer hinzugefügt werden, und wenn niedrig, dann 3 µl Farbstoffkonzentrat.

! Die vorbereitete Arbeitsfarbstofflösung ist innerhalb von 3 Stunden einsatzbereit.

*! Verwenden Sie zum Zubereiten einer Arbeitsfarbstofflösung **nur** Kunststoffgeräte. Glasgeräte können den Farbstoff an ihren Wänden sorbieren, was zu einer Abnahme der Farbstoffkonzentration in der Probe und somit zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen kann.*

3. Vorbereitung von Standard-RNA-Lösungen

- **Um im Bereich hoher RNA-Konzentrationen** (20 ng/ml bis 1000 ng/ml) zu arbeiten, bereiten Sie eine 2000 ng/mL RNA-Stammlösung vor. Fügen Sie hierzu 30 µl der RNA-Standardlösung aus dem Kit und 1,47 ml 1× TE-Puffer in das Röhrchen.

  Bereiten Sie dann im Plattenstandard RNA-Lösungen aus dieser Stammlösung bei folgenden Konzentrationen vor: 1000 ng/ml, 500 ng/ml, 100 ng/ml, 20 ng/ml und 0 ng/ml. Fügen Sie dazu nacheinander 1× TE-Puffer und 2000 ng/ml RNA-Stammlösung in die Vertiefungen der Platte in der in der untenstehenden Tabelle angegebenen Menge hinzu.

  Wichtig: *Die Arbeitsfarbstofflösung (die im Schritt 2 durch Verdünnen des Konzentrats um das 200-fache hergestellt wird) wird im Schritt 5 des Protokolls hinzugefügt.*

  Vorbereitung von RNA-Standards zur Erstellung einer Kalibrierungskurve im Bereich von 20 ng/ml bis 1000 ng/ml (**hohe Konzentrationsbereich**):

Volumen des zugegebenen 1× TE-Puffer zur Vertiefung des Plattenwells, µl	Volumen der zugegebenen RNA-Stammlösung 2000 ng/ml zur Vertiefung des Plattenwells, µl	Volumen der zugegebenen Arbeitslösung des Ribo488-Farbstoffs zur Vertiefung des Plattenwells, µl	RNA-Konzentration in der Standardlösung, ng/ml
0	100	100	1000
50	50	100	500
90	10	100	100
98	2	100	20
100	0	100	0

- **Um im niedrigen RNA-Konzentrationsbereich** (1 ng/ml — 50 ng/ml) zu arbeiten, bereiten Sie eine 100 ng/ml RNA-Stammlösung vor. Fügen Sie dazu 30 µl der RNA-Standardlösung aus dem Kit und 1,47 ml 1× TE-Puffer in das Reagenzglas und mischen Sie gründlich. Übertragen Sie dann 75 µl der vorbereiteten RNA-Lösung in ein neues Reagenzglas und fügen Sie 1,425 ml 1x TE-Puffer hinzu.

  Bereiten Sie RNA-Standardlösungen in der Platte mit den folgenden Konzentrationen vor: 50 ng/ml, 25 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml und 0 ng/ml. Fügen Sie dazu nacheinander 1× TE-Puffer und 100 ng/ml RNA-Stammlösung in die Vertiefungen der Platte in den in der untenstehenden Tabelle angegebenen Mengen hinzu.

  Wichtig: *Die Arbeitslösung des Farbstoffs (die durch Verdünnen des Konzentrats in Schritt 2 um den Faktor 2000 hergestellt wurde) wird später im Schritt 5 dieses Protokolls hinzugefügt.*

  Vorbereitung von RNA-Standards zur Erstellung einer Kalibrierlinie im Bereich von 1 ng/ml bis 50 ng/ml (**niedrige Konzentrationen**).

Volumen des zugegebenen 1× TE-Puffers in die Plattenvertiefung, µl	Volumen der zugegebenen RNA-Stamm-Lösung 100 ng/ml in die Plattenvertiefung, µl	Volumen der zugegebenen Arbeitslösung des Ribo488-Farbstoffs in die Plattenvertiefung, µl	RNA-Konzentration in der Standardlösung, ng/ml
0	100	100	50
50	50	100	25
90	10	100	5
98	2	100	1
100	0	100	0

4. Vorbereitung der experimentellen Proben

4.1. Verdünnen Sie die RNA-Proben in 1× TE-Puffer, sodass das endgültige Volumen für jede Probe 100 µl beträgt, und übertragen Sie sie in die Vertiefungen der Platte.

4.2. Fügen Sie den Standard-RNA-Lösungen und den experimentellen Proben 100 µl der Arbeitslösung des Ribo488-Farbstoffs hinzu. Mischen Sie alle Lösungen durch Pipettieren.

4.3. Inkubieren Sie die vorbereiteten Standard-RNA-Lösungen und experimentellen Proben 5 Minuten lang bei Raumtemperatur.

5. Messung der Fluoreszenzintensität der Standard-RNA-Lösungen und der experimentellen Proben

Da der Ribo488-Farbstoffkomplex mit RNA eine Absorptionsmaxima bei einer Wellenlänge von 493 nm und eine Emissionsmaxima bei 525 nm aufweist, ist die empfohlene Anregungswellenlänge für die Einstellung 480 nm und die Emissionswellenlänge 520 nm.

Die Empfindlichkeit des Fluorimeters sollte auf den Standard mit der höchsten RNA-Konzentration (50 ng/ml oder 1000 ng/ml) eingestellt werden, um sicherzustellen, dass die Fluoreszenzmessungen innerhalb des Erfassungsbereichs bleiben. Der Fluoreszenzpegel sollte nahe am maximalen RFU des Geräts liegen. Die Gain-Einstellungen des Fluorimeters sollten für optimale Empfindlichkeit bei der Arbeit mit RNA im **niedrigen** Konzentrationsbereich erhöht werden.

6. Berechnung der RNA-Konzentration

6.1. Ziehen Sie den Fluoreszenzwert der Standards ohne RNA vom Fluoreszenzwert der Proben mit RNA ab. Verwenden Sie diese Daten, um eine Kalibrierungskurve zu erstellen.

6.2. Erstellen Sie eine Kalibrierungskurve mit den Daten zum Fluoreszenzniveau der Standardlösungen in den Koordinaten: entlang der Abszissenachse (x) — die endgültige Konzentration von RNA in der Standardlösung; entlang der Ordinaten (y)

steht der Fluoreszenzwert.

6.3. Approximieren Sie die Daten mit einer linearen Funktion und finden Sie die Parameter der Funktionen A und B. Sie können unseren Taschenrechner zur Berechnung der RNA-Konzentration verwenden.

6.4. Die lineare Gleichung für Fluoreszenz (FL) versus Konzentration (C) lautet wie folgt:

$FL = A \times C + B;$

wobei FL die Fluoreszenzintensität in willkürlichen Einheiten ist, C die RNA-Konzentration und A und B die Parameter der linearen Funktion sind.

6.5. Bestimmung der RNA-Konzentration in der experimentellen Probe:

$C_{sample} = (FL_{sample} - B)/A;$

wobei FL_{sample} die Fluoreszenz der Probe ist und A und B die Parameter der gefundenen linearen Funktion sind.

6.6. Bestimmung der RNA-Konzentration in der Ausgangsprobe:

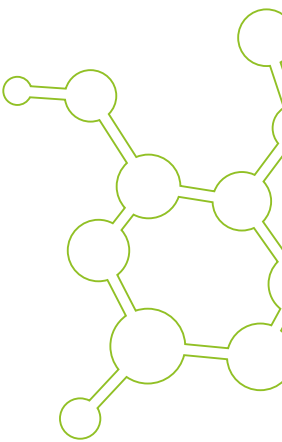
$C_{init} = V_{sample} \times C_{sample}/V_{init};$

wobei V_{sample} das Volumen der Probe ist und V_{init} das Volumen der ursprünglichen RNA-Lösung, das zur Herstellung der experimentellen Probe verwendet wurde.

NanoDrop™ — ist eine Marke von Thermo Fisher Scientific.

Ver. N7PFQ
#11510

22.09.509-QM
Issued by INSPECT



www.lumiprobe.com