

dsDNA-Quantifizierung mit PreciseGreen Reagenz

[PreciseGreen Reagenz für die dsDNA-Quantifizierung](#) dient der Bestimmung niedriger dsDNA-Konzentrationen, die mittels spektrophotometrischer Methode bei 260 nm nicht detektiert werden können. PreciseGreen Reagenz bindet selektiv an die doppelsträngige DNA, sodass Nukleotide, einzelsträngige DNA, RNA, Proteine und andere Verunreinigungen keinen Einfluss auf die Messergebnisse haben.

Der lineare Bereich für die DNA-Konzentrationsbestimmung mit PreciseGreen Reagenz reicht von 1 pg/μl bis 5 ng/μl. Der an die doppelsträngige DNA gebundene Farbstoff weist ein Absorptionsmaximum bei 503 nm und ein Emissionsmaximum bei 525 nm auf (Messungen können mit jedem Fluorometertyp durchgeführt werden). Für eine höhere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messwerte wird empfohlen, DNA-Proben und PreciseGreen Reagenz mit dem TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) zu verdünnen. Um die DNA-Konzentration in der Probe zu ermitteln, muss eine Kalibrierkurve mittels entsprechender Verdünnungen der DNA-Standardlösung erstellt werden.

Puffer, DNA-Standardlösung und PreciseGreen Reagenz sind im [PreciseGreen dsDNA-Quantifizierungskit](#) enthalten. [PreciseGreen Reagenz](#) kann auch separat bestellt werden. 1 ml des Reagenzes reicht für ca. 200 Messungen inkl. Proben und Standards bei einem Messvolumen von 2 ml (das Mindestmessvolumen für eine 3,5 ml Makroküvette). Die Anzahl der Messungen kann sich je nach Messvolumen ändern. Die empfohlenen Messvolumina für die gängigen fluorometrischen Geräte sind in der nachstehenden Tabelle angeführt.

Verfahren

1. Ansetzen der PreciseGreen Farbstoffarbeitslösung.

Tauen Sie das Farbstoffröhrchen auf und mischen Sie den Röhrcheninhalt gründlich. Setzen Sie eine ausreichende Menge der Farbstoffarbeitslösung unter Berücksichtigung der Probenanzahl an (Proben und DNA-Standardlösungen). Das Volumen der PreciseGreen Farbstoffarbeitslösung muss 50 % des Messvolumens betragen (das empfohlene Probenvolumen für ihren Fluorometer entnehmen Sie der nachstehenden Tabelle). Stellen Sie die Farbstoffarbeitslösung her, indem Sie 200x PreciseGreen Farbstoffkonzentrat mit dem Puffer 200-fach verdünnen (wir empfehlen die Verwendung des TE-Puffers: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5). Mischen Sie.

! Die angesetzte Farbstoffarbeitslösung ist innerhalb von 3 Stunden aufzubauchen.

! Um mögliche Pipettierverluste auszugleichen, stellen Sie einen 10–25 % Überschuss der Farbstoffarbeitslösung her. Verwenden Sie zur Berechnung des Volumens der Farbstoffarbeitslösung folgende Formel:

$$V_{\text{PreciseGreen}} = 5/8 \times V_{\text{Probe}} \times (N_{\text{Proben}} + N_{\text{Standards}}),$$
 wo V_{Probe} —Volumen einer Probe oder eines Standards, N_{Proben} — Anzahl der Proben und $N_{\text{Standards}}$ — Anzahl der DNA-Standards (inkl. der Leerprobe).

2. Vorbereitung der Proben

Verdünnen Sie die zu untersuchende DNA-Probe mit dem Puffer, sodass das Probenvolumen 50 % des Messvolumens beträgt (das Ausgangsvolumen der Probe kann beliebig sein, die Endkonzentration muss jedoch im Bereich von 1 pg/μl bis

5 ng/μl liegen). Fügen Sie das gleiche Volumen der PreciseGreen Farbstoffarbeitslösung hinzu. Mischen und inkubieren Sie für 5 Minuten.

Gehen Sie bei der Herstellung der Verdünnungen der DNA-Standardlösung genauso vor. Beachten Sie, dass die Verdünnungsstufen der DNA-Standardlösung im Konzentrationsbereich der DNA-Proben und im linearen Messbereich des von Ihnen verwendeten Geräts liegen müssen. Die DNA-Standardlösung ist nur als Bestandteil des PreciseGreen Kits erhältlich. Bei einer separaten Bestellung des PreciseGreen Reagenzes wird die DNA-Standardlösung nicht mitgeliefert.

Empfohlene Messvolumina für die DNA-Konzentrationsbestimmung mit PreciseGreen Farbstoff:

Gerätetyp	Messvolumen (V_{Probe})	Volumen der PreciseGreen Farbstoffarbeitslösung	Volumen verdünnter DNA- Probe
Küvetten-Fluorometer	3,5 ml Küvette	2 ml	1 ml
	Andere Küvetten	ca. 75 % des Küvettenvolumens	37,5 % des Küvettenvolumens
Mikroplatten-Fluorometer	96-Well-Mikroplatte*, pro Well	0.2 ml	0.1 ml
	24-Well-Mikroplatte*, pro Well	1 ml	0.5 ml
	Andere Mikroplatten	ca. 75 % des Wellvolumens	37,5 % des Wellvolumens
NanoDrop™ 3300*	0.1 ml	0.05 ml	0.05 ml

*Es wird empfohlen, ein Pipettiervolumen von weniger als 2 μl zu vermeiden, um die Genauigkeit und Präzision der Messungen zu gewährleisten.

3. Fluoreszenzmessung

Führen Sie Fluoreszenzmessungen der Standardlösungen und DNA-Proben durch (der an die doppelsträngige DNA gebundene Farbstoff weist ein Absorptionsmaximum bei 503 nm und ein Emissionsmaximum bei 525 nm auf).

4. DNA-Konzentrationsberechnung

Erstellen Sie eine Kalibrierkurve anhand der Angaben zur Fluoreszenz der Standardlösungen. Approximieren Sie diese Daten durch eine lineare Funktion und ermitteln Sie die Funktionsparameter A und B. Die lineare Abhängigkeit zwischen Fluoreszenz (FL) und Konzentration (C) sieht wie folgt aus:

$FL = A \times C + B$, wo FL — Fluoreszenzintensität in relativen Fluoreszenzeinheiten und C — DNA-Konzentration, A und B — Parameter der linearen Funktion.

DNA-Konzentration in einer verdünnten DNA-Probe:

$C_{\text{Probe}} = (FL_{\text{Probe}} - B)/A$, wo FL_{Probe} — Probenfluoreszenz, A und B — Parameter der ermittelten linearen Funktion.

DNA-Konzentration in der Ausgangsprobe:

$C_{init} = V_{Probe} \times C_{Probe} / V_{init}$, wo V_{Probe} — Messvolumen und V_{init} — Volumen der Ausgangsprobe, die zur Herstellung der Endprobe (in Messvolumen) verwendet wurde.

Um notwendige Berechnungen durchzuführen, verwenden Sie auch unsere Rechner: [Rechner für die DNA-Quantifizierung](#) und [Lösungs- und Verdünnungsrechner](#).

Beispiel einer linearen Regression: Fluoreszenz gegen DNA-Konzentration:

