



## Pico488 dsDNA quantification kit manual



## Contents

English: Pico488 dsDNA quantification kit manual .....	3-8
Deutsch: Handbuch für das Pico488 dsDNA-Quantifizierungskit .....	9-15
Русский: Инструкция к набору Pico488 для определения количества дцДНК .....	16-22

**Lumiprobe Corporation**  
(US and Worldwide)  
9:00AM - 9:00PM EST

Phone: +1 888 973 63 53

**Lumiprobe GmbH**  
(Germany and Europe)  
8:00AM - 5:00PM CE(S)T

Phone: +49 511 16596811

**Lumiprobe RUS Ltd**  
(Russia and CIS)  
8:00 - 19:00 GMT+3 (Moscow)

Phone: +7 800 775 3271



ISO 9001:2015

# Pico488 dsDNA quantification kit manual

The **Pico488 dsDNA quantification kit** is used for the quantification of double-stranded DNA if its concentration cannot be determined by measuring absorbance at 260 nm. Pico488 selectively binds to double-stranded DNA, so nucleotides, single-stranded DNA, RNA, proteins and other impurities do not impede the measurements.

The linear measurement range for DNA concentration with this kit is 1 pg/ $\mu$ L to 5 ng/ $\mu$ L. The dye bound to double-stranded DNA exhibits an excitation maximum at 503 nm and a fluorescence emission maximum at 525 nm. Any type of fluorometer can be used for the assay read-out.

## Kit components

Kit component	Count	
	1102-200 200 assays	B1102 200 assays
42010, Pico488 dsDNA quantification reagent, 200x solution in DMSO, 1 mL	1	—
12010, Pico488 dsDNA quantification reagent, 200x solution in DMSO, 100 $\mu$ L	—	10
N2150, TE buffer, 20x, 25 mL	1	1
B8650, dsDNA quantitative standard, 100 ng/ $\mu$ L in TE buffer, 1 mL	1	1

Store at temperature below 4°C. Do not freeze!

Shelf life 12 months.

The amount of dye solution supplied with the kit is sufficient to analyze 200 experimental data points with an assay volume of 2 ml each (i.e. the minimum assay volume required for measurements in a standard fluorometric cuvette with a volume of 3.5 ml). The number of measurements may differ depending on the assay volume

if other types of equipment are used for fluorescence detection. Recommended assay volumes for commonly used fluorometric equipment are provided in the table below.

Recommended volumes for dsDNA quantification with Pico488 dye:

Type of equipment		Assay volume ( $V_{\text{assay}}$ )	Volume of Pico488 dye working solution	Volume of DNA sample
Cuvette fluorometer	Standard fluorometric cuvette (3.5 ml)	2 ml	1 ml	1 ml
	Other fluorometric cuvettes	About 75 % of cuvette volume	37.5 % of cuvette volume	37.5 % of cuvette volume
Plate fluorometer	96-well plate*, per well	0.2 ml	0.1 ml	0.1 ml
	24-well plate, per well	1 ml	0.5 ml	0.5 ml
	Other plates	About 75 % of well volume	37.5 % of well volume	37.5 % of well volume
NanoDrop™ 3300*		0.1 ml	0.05 ml	0.05 ml

\* To maintain accuracy and precision of your measurements, we recommend to avoid pipetting volumes smaller than 2  $\mu\text{L}$ .

## Protocol

*! We recommend to prepare 10–25 % extra volume of the 1× TE buffer solution and dye working solution to account for possible pipetting errors.*

### 1. Preparation of 1× TE buffer

Prepare a sufficient amount of 1× TE buffer taking into account the assay volume and the number of samples (plus 5 dilutions of the dsDNA quantitative standard, see item 3). To prepare 1× TE buffer, dilute *the 20× TE concentrate* 20-fold with deionized water (see the table above to determine the recommended assay volumes for the fluorometric equipment used).

*Calculate the buffer volume ( $V_{1\times \text{buffer}}$ ) with the following formula:*

$$V_{1\times \text{buffer}} = V_{\text{assay}} \times (N_{\text{samples}} + 5),$$

*where  $V_{\text{assay}}$  — assay volume of a sample or standard,  $N_{\text{samples}}$  — number of samples, and 5 — number of standards (including a blank sample).*

### 2. Preparation of the Pico488 dye working solution

Thaw the Pico488 dye stock solution, then mix thoroughly. Prepare a sufficient amount of the Pico488 dye working solution taking into account the number of samples. The volume of the Pico488 dye working solution for each experimental data point should be equal to 50 % of the assay volume. To prepare the Pico488 dye working solution, dilute the *Pico488 stock solution* 200-fold with 1× TE buffer.

*! The dye working solution should to be used within 3 hours after preparation.*

*Calculate the volume of the Pico488 dye working solution ( $V_{\text{Pico488}}$ ) with the following formula:*

$$V_{\text{Pico488}} = 1/2 \times V_{\text{assay}} \times (N_{\text{samples}} + 5),$$

*where  $V_{\text{assay}}$  — assay volume of a sample or standard,  $N_{\text{samples}}$  — number of samples,*

and 5 — number of standards (including blank sample).

*! Use only plastic containers to prepare the dye working solution, as Pico488 can adsorb to glass surfaces, which results in decreasing of the dye concentration in samples and biases in the measurement results.*

### 3. Preparation of DNA standards

Prepare a DNA stock solution with a concentration of 2 ng/μL in 1× TE buffer by mixing 30 μL of the *dsDNA quantitative standard* from the kit with 1.47 mL of 1× TE buffer. From this stock solution, prepare a dilution series of standard DNA solutions with the following concentrations: 2 ng/μL, 200 pg/μL, 20 pg/μL, 2 pg/μL (see the table below).

*! The proposed dilution scheme for the DNA stock solution can be used for the preparation of a dilution series with DNA concentrations of 0 to 2 ng/μL. 1.5 mL of the DNA stock solution prepared according to this scheme is sufficient to prepare a dilution series for a 3.5 mL cuvette (assay volume 2 mL). For smaller assay volumes, the volume of the DNA stock solution can be reduced accordingly.*

Volume of 1× TE buffer, μL	Volume of DNA stock solution 2 ng/μL, μL	Concentration of DNA standard solution	Final concentration of DNA standard in assay volume
0	1000	2 ng/μL	1 ng/μL
900	100	200 pg/μL	100 pg/μL
990	10	20 pg/μL	10 pg/μL
999	1	2 pg/μL	1 pg/μL
1000	0	0 pg/μL	0 pg/μL

Mix each DNA standard solution with an equal volume of the dye working solution (for the assay volume refer to the table above).

*! In the case of non-linear progression of the calibration curve near the limits of the*

*instrument's dynamic range, adjust the concentrations of the standard solutions to match the fluorometer's capabilities.*

#### 4. Preparation of samples

Dilute each DNA sample with  $1\times$  TE buffer to a volume that equals 50 % of the assay volume. The final DNA concentration should be in the range of 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  to 5  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Add an equal volume of the Pico488 dye working solution and mix.

#### 5. Incubate all prepared standard solutions and experimental DNA samples for 5 minutes at room temperature.

#### 6. Fluorescence measurements

Measure the fluorescence emission intensity of all standard solutions and DNA samples with suitable filter settings. The dye bound to double-stranded DNA exhibits maximum absorption at 503 nm and maximum fluorescence emission at 525 nm.

#### 7. Calculation of dsDNA concentration

Create a calibration curve using the fluorescence values of the standard solutions. Fit a linear function to the data points to determine the function parameters A and B. The linear dependence between fluorescence (FL) and dsDNA concentration

© is as follows:

$FL = A \times C + B$ , where  $FL$  — fluorescence intensity in arbitrary units,  $C$  — dsDNA concentration, A and B — parameters of the linear function.

DNA concentration in the diluted sample:

$C_{\text{sample}} = (FL_{\text{sample}} - B)/A$ , where  $FL_{\text{sample}}$  — fluorescence intensity of the diluted sample, A and B — parameters of the linear function.

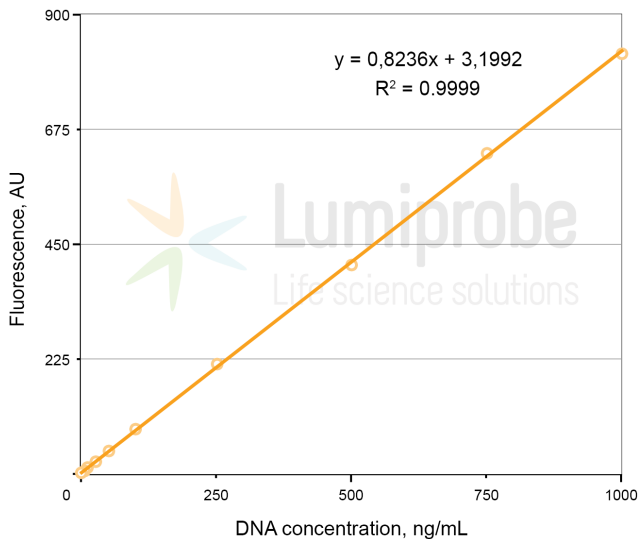
DNA concentration in the initial sample:

$C_{\text{init}} = V_{\text{assay}} \times C_{\text{sample}} / V_{\text{init}}$ , where  $V_{\text{assay}}$  — assay volume,  $V_{\text{init}}$  — the volume of the initial sample used for dilution with  $1\times$  TE buffer.



The following online calculators can be used for the described calculations: dsDNA quantification calculator and Solubilization and dilution calculator .

## Linear regression example: fluorescence versus DNA concentration



NanoDrop™ is a trademark of Thermo Fisher Scientific.

# Handbuch für das Pico488 dsDNA-Quantifizierungskit

Pico488 dsDNA-Quantifizierungskit dient der Bestimmung niedriger dsDNA-Konzentrationen, die mittels spektrophotometrischer Methode bei 260 nm nicht detektiert werden können. Pico488 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 dem Kit 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.

## Bestandteile

Komponente	Anzahl	
	1102-200 200 assays	B1102 200 assays
42010, Pico488 für die dsDNA-Quantifizierung, 200x-Lösung in DMSO, 1 mL	1	—
12010, Pico488 für die dsDNA-Quantifizierung, 200x-Lösung in DMSO, 100 µL	—	10
N2150, TE-Puffer, 20x, 25 mL	1	1
B8650, dsDNA-Standard / dsDNA quantitative standard, 100 ng/µL in TE-Puffer, 1 mL	1	1

Unter 4 °C lagern. Nicht einfrieren!

Haltbarkeit: 12 Monate.

Die oben aufgeführte Reagenzienmenge 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.

Empfohlene Messvolumina für die DNA-Konzentrationsbestimmung mit Pico488 Farbstoff:

Gerätetyp		Messvolumen ( $V_{\text{Probe}}$ )	Volumen der Pico488 Farbstoffarbeitslösung	Volumen verdünnter DNA- Probe
Küvetten-Fluorometer	3,5 ml Küvette	2 ml	1 ml	1 ml
	Andere Küvetten	ca. 75 % des Küvettenvolumens	37,5 % des Küvettenvolumens	37,5 % des Küvettenvolumens
Mikroplatten-Fluorometer	96-Well-Mikroplatte*, pro Well	0,2 ml	0,1 ml	0,1 ml
	24-Well-Mikroplatte*, pro Well	1 ml	0,5 ml	0,5 ml
	Andere Mikroplatten	ca. 75 % des Wellvolumens	37,5 % des Wellvolumens	37,5 % des Wellvolumens
NanoDrop™ 3300*		0,1 ml	0,05 ml	0,05 ml

*\*Es ist empfohlen, ein Pipettiervolumen von weniger als 2  $\mu$ l zu vermeiden, um die Genauigkeit und Präzision der Messungen zu gewährleisten.*

# Verfahren

*! Um mögliche Pipettierverluste auszugleichen, stellen Sie einen 10–25 % Überschuss der 1x TE Pufferlösung und Farbstoffarbeitslösung her.*

## 1. Ansetzen der 1x TE Pufferlösung

Stellen Sie eine ausreichende Menge der 1x TE Pufferlösung unter Berücksichtigung von Messvolumen und Probenanzahl her (inkl. 5 Verdünnungen des dsDNA-Standards, siehe Punkt 3). Den 1x TE Puffer erhalten Sie, indem Sie *20x TE Konzentrat* mit deionisiertem Wasser 20-fach verdünnen (prüfen Sie das empfohlene Messvolumen für das verwendete Gerät anhand der Tabelle).

*Verwenden Sie zur Berechnung des Puffervolumens ( $V_{1x\text{ Puffer}}$ ) folgende Formel:*

$$V_{1x\text{ Puffer}} = V_{\text{Probe}} \times (N_{\text{Proben}} + 5),$$

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

## 2. Ansetzen der Farbstoffarbeitslösung

Tauen Sie das Farbstoffröhrchen auf und mischen Sie den Röhrcheninhalt gründlich. Setzen Sie eine ausreichende Menge der Arbeitslösung unter Berücksichtigung der Probenanzahl an. Das Volumen der Pico488 Farbstoffarbeitslösung muss 50 % des Messvolumens betragen. Stellen Sie die Farbstoffarbeitslösung her, indem Sie *200x Pico488 Farbstoffkonzentrat* mit 1x TE Puffer 200-fach verdünnen.

*! Angesetzte Farbstoffarbeitslösung ist innerhalb von 3 Stunden aufzubrauchen.*

*Verwenden Sie zur Berechnung des Volumens der Pico488 Farbstoffarbeitslösung ( $V_{\text{Pico488}}$ ) folgende Formel:*

$$V_{\text{Pico488}} = 1/2 \times V_{\text{Probe}} \times (N_{\text{Proben}} + 5),$$

*wo  $V_{\text{Probe}}$  — Volumen einer Probe oder eines Standards,  $N_{\text{Proben}}$  — Anzahl der Proben*

und 5 — Anzahl der DNA-Standards (inkl. der Leerprobe).

*! 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. Ansetzen der Standards

Stellen Sie eine DNA-Stammlösung mit einer Konzentration von 2 ng/μl in 1x TE Puffer her, indem Sie 30 μl *dsDNA-Standard* aus dem Kit mit 1,47 ml 1x TE Puffer in einem Röhrchen mischen. Stellen Sie aus dieser Stammlösung DNA-Standardlösungen mit folgenden Konzentrationen her: 2 ng/μl, 200 pg/μl, 20 pg/μl, 2 pg/μl (siehe nachstehende Tabelle).

*! Das vorgeschlagene Verdünnungsschema der DNA-Stammlösung berücksichtigt Pipettierverluste bei der Herstellung von Verdünnungen mit einer DNA-Endkonzentration von 0 bis 2 ng/μl. Die nach diesem Schema angesetzten 1,5 ml DNA-Stammlösung reichen für die Herstellung der DNA-Standardlösungen für Messungen in einer 3,5 ml Küvette (bei einem Messvolumen von 2 ml). Für ein kleineres Messvolumen kann ein geringeres Volumen der DNA-Stammlösung angesetzt werden.*

Volumen der 1x TE Pufferlösung, μl	Volumen der DNA- Stammlösung 2 ng/μl, μl	Konzentration der DNA- Standardlösung	Endkonzentration des DNA-Standards im Messvolumen
0	1000	2 ng/μl	1 ng/μl
900	100	200 pg/μl	100 pg/μl
990	10	20 pg/μl	10 pg/μl
999	1	2 pg/μl	1 pg/μl
1000	0	0 pg/μl	0 pg/μl

Mischen Sie jede DNA-Standardlösung mit der Farbstoffarbeitslösung im Verhältnis 1:1 (prüfen Sie das Messvolumen ( $V_{\text{Probe}}$ ) anhand der obigen Tabelle).

*! Stellen Sie einen nicht linearen Verlauf der Kalibrierkurve an den Grenzen des dynamischen Bereichs des Gerätes fest, so passen Sie die Konzentrationen der Standardlösungen an, um die Möglichkeiten des Fluorometers optimal zu nutzen.*

#### **4. Vorbereitung der Proben**

Verdünnen Sie die zu untersuchende DNA-Probe mit 1x TE-Puffer, sodass das Probenvolumen 50 % des Messvolumens beträgt (das Ausgangsvolumen der Probe kann beliebig sein, die Endkonzentration muss jedoch im Bereich von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  bis 5  $\text{ng}/\mu\text{l}$  liegen). Fügen Sie das gleiche Volumen der Pico488 Farbstoffarbeitslösung hinzu und mischen Sie.

#### **5. Inkubieren Sie alle hergestellten Standardlösungen und DNA-Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur.**

#### **6. 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).

#### **7. 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:

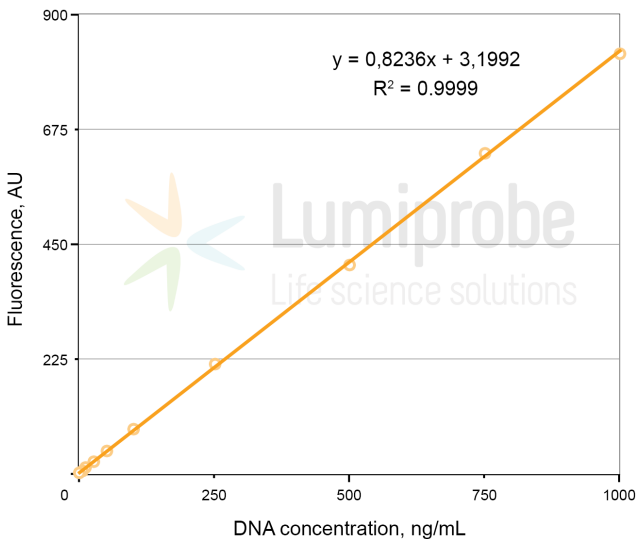
$C_{\text{Probe}} = (FL_{\text{Probe}} - B)/A$ , wo  $FL_{\text{Probe}}$  — Probenfluoreszenz, A und B — Parameter der ermittelten linearen Funktion.

DNA-Konzentration in der Ausgangsprobe:

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

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

## Beispiel einer linearen Regression: Fluoreszenz gegen DNA-Konzentration



NanoDrop™ ist eine Marke von Thermo Fisher Scientific



# Инструкция к набору Pico488 для определения количества дцДНК

Набор Pico488 для определения количества ДНК предназначен для определения низких концентраций двухцепочечной ДНК (не определяемых спектрофотометрическим методом при длине волны 260 нм). Благодаря селективному связыванию красителя Pico488 с двухцепочечной ДНК на результаты измерения не влияет присутствие в пробе нуклеотидов, одноцепочечной ДНК, РНК, белков и других примесей.

Линейный диапазон измерения концентрации ДНК с использованием набора составляет от 1 пг/мкл до 5 нг/мкл. Краситель, связанный с молекулой двухцепочечной ДНК, имеет максимум поглощения при длине волны 503 нм и максимум испускания при 525 нм. Для проведения измерений подойдет любой тип флуориметра.

## Состав набора

Компонент набора	Количество	
	1102-200 200 assays	B1102 200 assays
42010, Краситель Pico488 для определения концентрации дцДНК, 200x раствор в ДМСО, 1 mL	1	—
12010, Краситель Pico488 для определения концентрации дцДНК, 200x раствор в ДМСО, 100 uL	—	10
N2150, Буфер TE, 20x, 25 mL	1	1
B8650, Стандарт дцДНК / dsDNA quantitative standard, 100 ng/uL в TE буфере, 1 mL	1	1

Хранить при температуре до 4°C. Не замораживать!

Срок хранения 12 месяцев.

Указанное выше количество реагентов рассчитано для проведения 200 измерений при работе с объемом измеряемого образца 2 мл (минимально необходимый объём образца для измерений в стандартной флуориметрической кювете объёмом 3.5 мл). Количество измерений может варьироваться в зависимости от объема образца. Рекомендуемые объёмы образца для наиболее популярного флуориметрического оборудования представлены ниже в таблице.

Рекомендуемые объёмы для измерения концентрации ДНК с помощью красителя Pico488:

Тип оборудования		Общий объём образца ( $V_{\text{образца}}$ )	Объём рабочего раствора красителя Pico488	Объём экспериментального раствора ДНК
Кюветный флуориметр	Стандартная флуориметрическая кювета (3.5 мл)	2 мл	1 мл	1 мл
	Другие флуориметрические кюветы	около 75 % объёма кюветы	37.5 % объёма кюветы	37.5 % объёма кюветы
Планшетный флуориметр	96-луночный планшет*, на лунку	0.2 мл	0.1 мл	0.1 мл
	24-луночный планшет, на лунку	1 мл	0.5 мл	0.5 мл
	Другие планшеты	около 75 % объёма лунки	37.5 % объёма лунки	37.5 % объёма лунки
NanoDrop™ 3300*		0.1 мл	0.05 мл	0.05 мл

\* Для обеспечения точности измерений рекомендуется избегать дозирования

объёмов менее 2 мкл.

## Протокол

*! Чтобы нивелировать возможные ошибки дозирования, мы рекомендуем приготовить 1х ТЕ буфер и рабочий раствор красителя Pico488 с запасом 10–25 %.*

### 1. Приготовление 1х ТЕ буфера

Приготовьте необходимое количество 1х буфера исходя из объёма образца и количества измеряемых образцов (включая 5 разведений стандартного раствора ДНК, см. п.3). Для получения 1х буфера разведите 20х концентрат ТЕ буфера в 20 раз деионизированной водой (уточните в таблице выше рекомендуемый объём образца для используемого оборудования).

*Для расчета необходимого объёма буфера ( $V_{1x \text{ буфера}}$ ) воспользуйтесь следующей формулой:*

$$V_{1x \text{ буфера}} = V_{\text{образца}} \times (N_{\text{образцов}} + 5),$$

*где  $V_{\text{образца}}$  — измеряемый объем исследуемого образца или стандарта,  $N_{\text{образцов}}$  — количество измеряемых образцов, и 5 — количество измеряемых стандартов (включая образец с нулевой концентрацией ДНК).*

### 2. Приготовление рабочего раствора красителя Pico488

Разморозьте и тщательно перемешайте содержимое пробирки с красителем. Приготовьте достаточное количество рабочего раствора красителя для всех образцов: объём рабочего раствора красителя должен составить 50 % от общего объёма измеряемого образца. Для получения рабочего раствора красителя разведите 200х концентрат красителя Pico488 в 200 раз приготовленным 1х ТЕ буфером.

*! Готовый рабочий раствор красителя пригоден для использования в течение 3 часов.*

Для расчета необходимого объема рабочего раствора красителя ( $V_{\text{Рисо488}}$ ) воспользуйтесь следующей формулой:

$$V_{\text{Рисо488}} = 1/2 \times V_{\text{образца}} \times (N_{\text{образцов}} + 5),$$

где  $V_{\text{образца}}$  — измеряемый объем исследуемого образца или стандарта,  $N_{\text{образцов}}$  — количество измеряемых образцов, и 5 — количество измеряемых стандартов (включая образец с нулевой концентрацией ДНК).

**!** Для приготовления рабочего раствора красителя используйте только пластиковую посуду. Стеклоянная посуда может сорбировать на своих стенках краситель, что приведет к снижению концентрации красителя в образцах и, как следствие, скажется на результатах измерений.

### 3. Приготовление стандартных растворов ДНК

Приготовьте стоковый раствор ДНК с концентрацией 2 нг/мкл в 1х ТЕ буфере: внесите в пробирку 30 мкл *стандарта дцДНК* из набора и 1.47 мл 1х ТЕ буфера. Используя этот стоковый раствор, приготовьте стандартные растворы ДНК следующих концентраций: 2 нг/мкл, 200 пг/мкл, 20 пг/мкл, 2 пг/мкл (см. таблицу ниже).

**!** Предлагаемая схема разведений стандартного раствора ДНК дана с запасом на погрешности дозирования при приготовлении разведений с концентрацией ДНК 0–2 нг/мкл. Приготовленного по данной схеме стокового раствора ДНК объемом 1.5 мл достаточно для приготовления стандартных растворов ДНК при проведении измерений в кювете 3.5 мл (объем образца 2 мл). При использовании меньшего объема образца стоковый раствор ДНК может быть приготовлен в меньшем объеме.

Объем 1x ТЕ буфера, мкл	Объем стокового раствора ДНК 2 нг/мкл, мкл	Концентрация стандартного раствора ДНК	Конечная концентрация стандарта в измеряемом объеме
0	1000	2 нг/мкл	1 нг/мкл
900	100	200 пг/мкл	100 пг/мкл
990	10	20 пг/мкл	10 пг/мкл
999	1	2 пг/мкл	1 пг/мкл
1000	0	0 пг/мкл	0 пг/мкл

Смешайте каждый стандартный раствор ДНК с рабочим раствором красителя в соотношении 1:1 (конечный объем образца ( $V_{\text{образца}}$ ) уточните в таблице выше). Перемешайте.

*! При обнаружении нелинейности калибровочной кривой на границах динамического диапазона прибора скорректируйте концентрации стандартов для оптимального использования возможностей флуориметра.*

#### 4. Приготовление экспериментального образца

Разведите исследуемый образец ДНК в 1x ТЕ буфере таким образом, чтобы объем образца составил 50 % измеряемого объема (исходный объем образца может быть любым, однако конечная концентрация должна соответствовать диапазону 1 пг/мкл—5 нг/мкл). Добавьте равный объем рабочего раствора красителя Pico488. Перемешайте.

#### 5. Инкубируйте приготовленные растворы стандартов и экспериментального образца 5 минут при комнатной температуре.

#### 6. Измерение флуоресценции

Измерьте интенсивность флуоресценции стандартных растворов ДНК и экспериментальных образцов ДНК (краситель, связанный с молекулой

двухцепочечной ДНК, имеет максимум поглощения при длине волны 503 нм и максимум испускания при 525 нм).

## 7. Расчёт концентрации ДНК

Постройте калибровочную кривую, используя данные об уровне флуоресценции стандартных растворов. Аппроксимируйте данные линейной функцией, найдите параметры функции  $A$  и  $B$ . Линейное уравнение зависимости флуоресценции ( $FL$ ) от концентрации ( $C$ ) выглядит следующим образом:

$FL = A \times C + B$ , где  $FL$  — интенсивность флуоресценции в условных единицах,  $C$  — концентрация ДНК,  $A$  и  $B$  — параметры линейной функции.

Концентрация ДНК в экспериментальном образце:

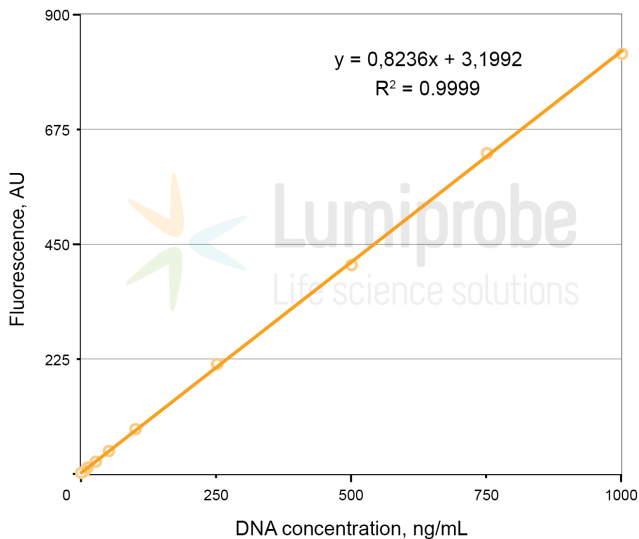
$C_{\text{образца}} = (FL_{\text{образца}} - B)/A$ , где  $FL_{\text{образца}}$  — флуоресценция образца,  $A$  и  $B$  — параметры найденной линейной функции.

Концентрация ДНК в исходном образце:

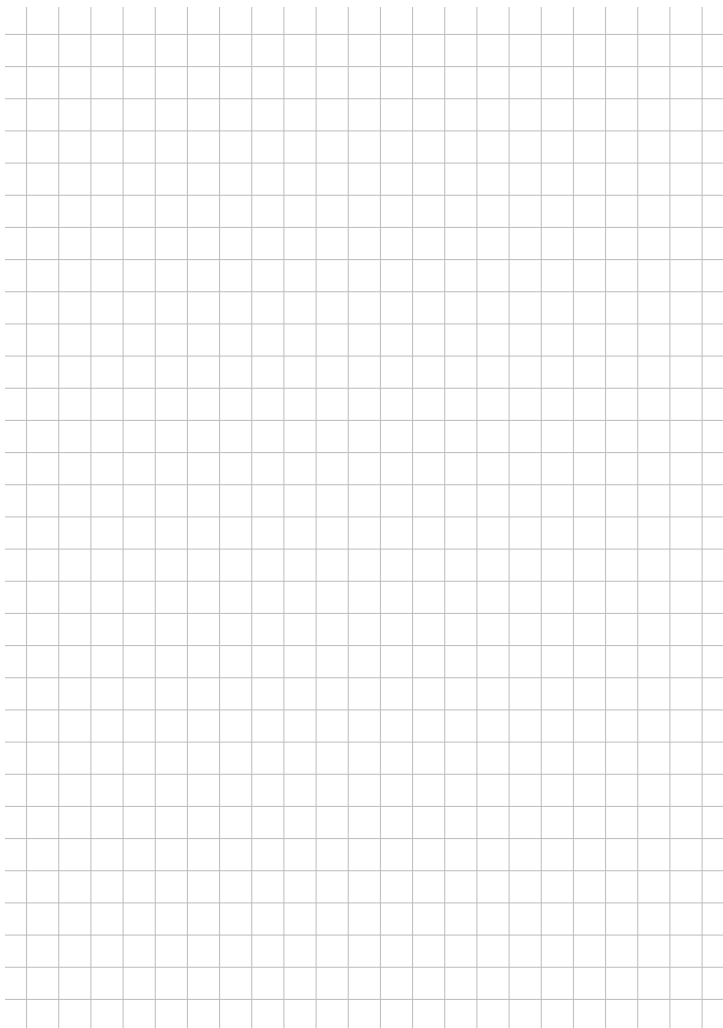
$C_{\text{исх}} = V_{\text{образца}} \times C_{\text{образца}} / V_{\text{исх}}$ , где  $V_{\text{образца}}$  — объём образца и  $V_{\text{исх}}$  — объём исходного раствора ДНК, использованный для приготовления экспериментального образца.

Для проведения необходимых вычислений мы рекомендуем воспользоваться нашими калькуляторами: для **расчета концентрации ДНК** и **приготовления/разбавления растворов**.

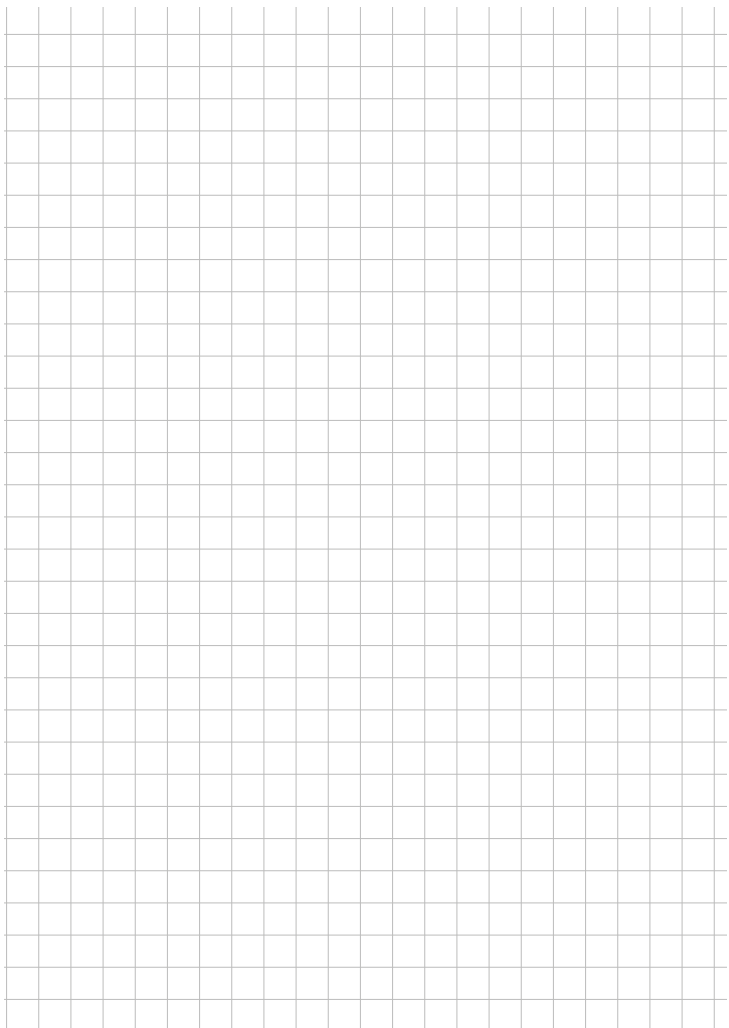
## Пример уравнения зависимости флуоресценции от концентрации ДНК:



NanoDrop™ — зарегистрированная торговая марка Thermo Fisher Scientific.











## **Lumiprobe Corporation**

(US and Worldwide)

9:00AM - 9:00PM EST

201 International Circle, Suite 135

Hunt Valley, Maryland 21030

USA

Phone: +1 888 973 63 53

## **Lumiprobe GmbH**

(Germany and Europe)

8:00AM - 5:00PM CE(S)T

Feodor-Lynen-Strasse 23

30625 Hannover

Germany

Phone: +49 511 16596811

## **Lumiprobe RUS Ltd**

(Russia and CIS)

8:00 - 19:00 GMT+3 (Moscow)

Kotsyubinskogo 4, bld. 3

121351 Moscow

Russian Federation

Phone: +7 800 775 3271



ISO 9001:2015

Issued by TÜV NORD CERT GmbH

[www.lumiprobe.com](http://www.lumiprobe.com)